UNIVERSITÉ DE STRASBOURG — FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE SCOLAIRE 1941-1942 — N° 292

Contribution à l'Étude des FERMENTATIONS dans le JUS de CHOUCROUTE

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 4 Mai 1942
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le grade de Docteur de l'Université
(Mention Pharmacie)

par

MOUSSA Fawzi

Pharmacien

Examinateurs de la Thèse : M. A. SARTORY. Doyen, Président
M. Ch. LAPP, Professeur
M. P. CORDIER, Professeur
} Juges

IMPRIMERIE
GÉNÉRALE
Jean de Bussac
2, Cours Sablon,
Clermont-Fd

1941

UNIVERSITE DE STRASBOURG FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE SCOLAIRE 1941-1942 N° 292

Contribution à l'Étude des FERMENTATIONS dans le JUS de CHOUCROUTE

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 4 Mai 1942
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le grade de Docteur de l'Université
(Mention Pharmacie)

par

MOUSSA Fawzi

Pharmacien

Examinateurs de la Thèse : M. A. SARTORY. Doyen, Président
M. Ch. LAPP, Professeur
M. P. CORDIER, Professeur
} Juges

IMPRIMERIE
GÉNÉRALE
Jean de Bussac
2, Cours Sablon,
Clermont-Fd

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. A. SARTORY, *Doyen*, C. ✻, I. ✪, C. ✠
VOLMAR, *Assesseur*, ✻, I. ✪.
MARANDON, *Secrétaire*, ✻, ✠, ✠, ✪.

DOYEN HONORAIRE

M. JADIN, O. ✻, I. ✪, ✠.

PROFESSEURS

MM.	A. SARTORY, C. ✻, I. ✪, C. ✠	Bactériologie.
	LAVIALLE, ✻, I. ✪, ✠	Botanique
	VOLMAR, ✻, I. ✪	Chimie organique.
	GUILLAUME, O. ✻, ✠, I. ✪, ✠	Pharmacie galénique.
	LAPP, I. ✪	Chimie analytique.
	CORDIER, ✪	Pharmacie chimique.
	R. SARTORY, ✪, ✠	Matière médicale.

MAITRE DE CONFÉRENCE

M.	DUQUENOIS	Toxicologie.

PROFESSEUR HONORAIRE

M. JADIN, O. ✻, I. ✪, ✠.

COURS COMPLÉMENTAIRES

MM.	A. SARTORY	Hygiène.
	LAVIALLE	Hydrologie.
	VOLMAR	Chimie minérale.
	GUILLAUME	Zoologie
	LAPP	Physique
	PRÉLOT	Législation et Déontologie.
	CORDIER	Chimie biologique.
	R. SARTORY	Cryptogamie.
	Mme LALLEMAND, ✪	Pharmacodynamie

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	COLLARD, ✠, I. ✪	Chimie pharmaceutique.
	Mme LALLEMAND, ✪	Chimie et Physique.
	JÆGER	Histoire naturelle.
	LEDOUX	Bactériologie et Parasitologie

A LA MÉMOIRE DE MA MÈRE

Dont l'affection me fut ravie si tôt et dont le cher souvenir restera toujours vivant en moi.

A la joie d'avoir accompli son rêve, se mêle l'infinie tristesse de ne plus l'avoir.

A MON PÈRE

Auquel je dois tout, en faible témoignage de ma vive tendresse et de la reconnaissance que je lui dois pour m'avoir permis de poursuivre mes études. Qu'il trouve ici l'expression de mon ardente piété filiale.

A MA SŒUR ET A MES FRÈRES

A MA BELLE-SŒUR ET MES NIÈCES

Avec l'assurance de ma profonde affection. Je leur dédie ce travail. En gage de reconnaissance et d'amour fraternel.

A MADAME ET MONSIEUR MOURAD

A TOUTE MA FAMILLE

En témoignage de ma vive reconnaissance.

A mon Maître et Président de Thèse :

MONSIEUR A. SARTORY

Doyen de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
Professeur de Bactériologie
à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Strasbourg
Commandeur de la Légion d'Honneur

Expression de ma gratitude entière, admiration déférente et parfait dévouement.

A mes Juges :

MONSIEUR LE PROFESSEUR CH. LAPP

Professeur de Chimie Analytique et de Toxicologie
de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Témoignage de mon respect et de ma reconnaissance.

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. CORDIER

Professeur de Pharmacie chimique
de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Hommage de profonde gratitude.

A MONSIEUR JACQUES MEYER

A MONSIEUR FOUAD HABASHY

et à tous ceux qui me sont fidèles et qui m'ont souhaité le bonheur et la réussite.

En gage de reconnaissance et d'une amitié profonde et durable.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543517_0062

AVANT PROPOS

Avant d'entrer dans l'exposé de ce travail, nous remercions Monsieur le Professeur A. Sartory, Doyen de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, pour ce travail intéressant qu'il a bien voulu nous confier et pour l'intérêt qu'il a porté à nos recherches. Il n'a cessé pendant tout notre séjour à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, de nous encourager et de nous conseiller avec une amabilité sans égale. Qu'il trouve ici l'expression de notre entière gratitude.

Nous avons pu arriver à ce résultat grâce à M. Ledoux, Chef de Travaux de Bactériologie et de Parasitologie, qui, avec une grande amabilité, n'a cessé de nous encourager et de nous prodiguer ses conseils.

Il nous a été donné, pendant cette période de nous familiariser avec des méthodes délicates et des techniques spéciales, et nous avons largement fait appel à la compétence de Monsieur Wurtz, assistant, auprès de qui nous trouvâmes toujours l'accueil le plus aimable ; nous lui adressons toute notre reconnaissance pour nous avoir prêté son concours et prodigué son soutien moral pendant l'élaboration de ce travail.

En reconnaissance de tout ce qu'il a fait pour nous, nous lui disons merci et le prions de croire à notre affectueux attachement et à l'expression de notre dévouement le plus complet. Nous remercions bien vivement Monsieur le Professeur Ch. Lapp et Monsieur le Professeur P. Cordier, qui ont accepté avec empressement de faire partie de notre Jury de Thèse.

Avant de quitter la Faculté et la France, nous ne voudrions pas oublier que notre éducation scientifique a été faite à la

Faculté de Pharmacie de Strasbourg ; que notre cher et vénéré Doyen et tous nos Maitres en cette maison reçoivent ici l'expression de notre gratitude respectueuse et bien sincère. Nous les quittons avec regret ainsi que les camarades français, en particulier strasbourgeois et clermontois, pour l'amitié et les témoignages de fraternité qui nous ont unis sur cette terre de France, infiniment hospitalière. Qu'ils soient surs de trouver auprès de nous, en Egypte, l'accueil le plus sincère et le plus cordial. Soyez certains, mes chers amis, que nous ferons tout ce qui est en notre pouvoir pour sceller davantage les liens séculaires qui unissent nos deux pays.

Notre travail est divisé en trois parties :

Première partie : Fabrication industrielle de la Choucroute.

Deuxième partie : Microbiologie de la fermentation.

Chapitre I : Techniques d'isolement.

Chapitre II : Organismes responsables de la fermentation.

Chapitre III : Propriétés biochimiques.

Troisième partie : Biochimie de la fermentation.

Chapitre I : Les principaux composés de dégradation de la cellulose. Dosages. Courbes.

Chapitre II : Les intermédiaires.

Chapitre III : Les mécanismes de la fermentation lactique.

INTRODUCTION

La choucroute, ainsi qu'on le sait, est le produit d'une fermentation que subit le chou, placé dans des conditions spéciales que nous décrivons un peu plus loin, sous l'influence de certains microorganismes.

Cette transformation a déjà fait l'objet de nombreuses études, tant au point de vue chimique que microbiologique et le principal agent de la fermentation a été caractérisé et étudié depuis fort longtemps.

Il s'agit de *l'Oïdium Lactis*, Fresenius, après les travaux de Duclaux et de nombreux auteurs parmi lesquels nous ne voudrions pas oublier de mentionner ceux de notre maître, M. le Doyen A. Sartory.

L'action de cet organisme dans les fermentations lactiques en général, et celle du chou, en particulier, n'est plus à mettre en doute. Mais *l'Oïdium Lactis* est loin d'être le seul hôte des jus de fermentation, comme il nous a été facile de le constater. A côté de lui, nous avons relevé l'existence de plusieurs microorganismes, tant Bactéries que Champignons, et il nous a paru intéressant de rechercher le rôle qu'ils jouent dans les processus qui conduisent le chou à l'état de choucroute.

D'autre part, ces processus, eux-mêmes, quoique très étudiés, font encore l'objet de nombreuses controverses. Nous n'avons pas la prétention de résoudre la question ; nous nous sommes uniquement attachés à rechercher et mettre en évidence les principaux composés chimiques caractérisant la fermentation lactique, composés sur l'existence desquels l'unanimité est à peu près absolue. L'étude de l'évolution de ces corps, au fur et à mesure que la fermentation avance, pour aboutir à ses derniers

stades, constitue un aspect de la question à laquelle nous essayons d'apporter notre modeste contribution.

Ayant isolé un certain nombre d'organismes du jus d'une choucroute livrée par le commerce, nous avons essayé, en les ensemençant, soit isolément, soit en symbiose sur une macération de chou stérile, de mettre en évidence les mêmes composés chimiques que ceux décelés dans le jus de choucroute fourni par le commerce.

Il nous sera possible ainsi de préciser le rôle des principaux organismes intervenant dans la fermentation, et de voir s'il en est d'inutiles ou même de nuisibles ; ce sera l'objet de notre conclusion.

Il nous a paru intéressant d'indiquer dans une première partie les procédés de fabrication de la choucroute.

La deuxième partie de nos recherches portera sur l'isolement, la caractérisation et la biologie des principaux microorganismes responsables de la fermentation que subit le chou en se transformant en choucroute.

Ces microorganismes se classent soit parmi les Bactéries, soit parmi les Champignons. Il est évident qu'il en existe beaucoup d'espèces sur les feuilles de choux, nous nous efforcerons d'en caractériser le plus grand nombre, bien persuadés qu'il ne nous sera pas possible de les dénombrer dans leur totalité. Mais beaucoup parmi eux ne jouent aucun rôle dans la fermentation proprement dite. Ce sont uniquement les responsables de celle-ci que nous nous efforcerons de mettre en évidence.

Cette question a déjà été étudiée par de nombreux auteurs, ainsi que nous avons pu nous en apercevoir dans nos recherches bibliographiques. Mais il ne semble pas, à notre connaissance du moins, qu'on lui ait donné le complément d'étude chimique indispensable pour permettre de conclure à la nécessité, à l'inutilité ou à la nocivité de tel ou tel organisme dans la fermentation. C'est donc sous cet angle, surtout physiologique, que nous entreprenons la partie microbiologique de notre étude.

Le premier chapitre de cette partie sera consacré à la description des techniques d'isolement, en particulier celles qui nous ont donné les meilleurs résultats.

Dans le deuxième chapitre, nous étudions la morphologie et la position dans la systématique des principaux

microorganismes isolés, ainsi que les milieux de culture préférentiels de chacun. L'étude biologique et physiologique de ces organismes termine ce chapitre. Nous avons surtout recherché l'influence des facteurs extérieurs sur leur naissance, leur vitalité et leur nutrition.

Enfin, le troisième chapitre sera consacré à l'étude de leurs propriétés biochimiques, notamment l'action sur les sucres, les protides, la gélatine, la glycérine, l'acide lactique et la cellulose. Nous indiquerons parmi ces substances celles qui sont attaquées pour donner lieu à un processus de fermentation.

La troisième partie de notre étude est consacrée à la caractérisation des principales substances chimiques qui ont pris naissance dans la fermentation du chou.

Parmi les nombreuses études concernant l'ensemble de ces corps et les processus de la fermentation, nous nous sommes reportés aux recherches très récentes de M. Schœn pour essayer de déceler dans notre macération les corps qui se forment dans la fermentation lactique. Si nous trouvons ces corps, nous serons autorisés à assimiler le mécanisme de la fermentation lactique à celui qui a lieu dans la fermentation des choux frais.

Nous nous limiterons, d'ailleurs, au métabolisme des corps organiques.

La cellulose étant le constituant essentiel de la feuille du chou, c'est la transformation de ce composé en ses principaux produits de dégradation qui nous intéresse avant tout. Nous laisserons de côté le métabolisme de tous les autres constituants.

Dans les processus de décomposition de la cellulose et de ses produits de décomposition, certains jouent le rôle d'intermédiaires, d'autres sont des produits de dégradation ultime.

Dans un premier chapitre, nous avons commencé par rechercher ces produits dans une macération âgée, où les transformations étaient arrivées à des stades avancés (sucre, acide lactique, acide oxalique, acide citrique, acide butyrique). Puis nous mentionnons les recherches ayant tendance à montrer l'existence d'intermédiaires tels que le méthylglyoxal, l'acide pyruvique, les fonctions alcool, cétone, aldéhyde, etc.

Dans un deuxième chapitre, nous avons suivi l'évolution des plus caractéristiques parmi eux, c'est-à-dire les sucres et l'acide lactique, en dosant ces substances au fur et à mesure que la fermentation avançait.

Dans un troisième chapitre, enfin, nous indiquons quelles sont les conceptions modernes des mécanismes de la transformation d'un hexose en acide lactique, et dans quelle mesure ces conceptions s'appliquent au cas qui nous occupe.

L'objet de notre conclusion se dégage de toute cette étude ; nous devons montrer comment la cellulose du chou est transformée pour donner les produits que nous avons décelés dans le jus de fermentation à divers stades. Les diverses étapes doivent s'enchaîner et rendre compte de la disparition et de l'apparition de certains intermédiaires. Enfin ces diverses étapes s'amorcent sous l'influence d'agents variés ; nous montrerons quel est le rôle de chacun d'eux.

PREMIERE PARTIE

LA CHOUCROUTE

On donne le nom de « Choucroute » à des choux réduits en lanières et soumis à la fermentation.

L'usage de la choucroute est surtout répandu dans les provinces de l'est de la France, en Alsace et en Lorraine, ainsi qu'en Autriche et en Allemagne.

D'après Rolet (1), la consommation de la choucroute a plutôt une tendance à diminuer par suite de la concurrence des légumes frais dont nos marchés sont alimentés à peu près toute l'année. La mauvaise qualité des produits livrés par quelques fabricants a aussi une influence désastreuse sur la vente dans certaines régions. Planterait-on dix fois plus de choux, il est douteux que l'on mangerait un kilo de choucroute de plus pour cela. Il est beaucoup plus facile de cultiver des choux que de faire de la choucroute et de la vendre. Il semble que la culture de chou à choucroute n'aurait pas en France l'avenir que quelques-uns ont voulu lui prédire. On croit aussi qu'il est impossible d'obtenir ailleurs des choux semblables à ceux qui ne peuvent être cultivés uniquement que dans cinq villages d'Alsace (situés entre Obernai et Erstein, banlieue de Strasbourg), lesquels ont, en quelque sorte, le monopole de cette culture et alimentent, non seulement les fabricants de choucroute, mais encore tous les marchés de la haute et basse Alsace.

Peut-être y a-t-il quelque exagération dans cette argumentation. La production des choux recherchés est sans doute une question de sélection et de mode de culture qu'il n'est pas impossible d'atteindre pour nos cultivateurs. Il existe pas mal de fabriques de choucroute en France qui emploient des choux du pays et qui écoulent facilement leurs produits.

Il n'est pas exagéré de prétendre que la consommation de la choucroute augmenterait si cet aliment était, par son prix, plus à la portée des petites bourses. Il en serait probablement ainsi avec la concurrence qui naîtrait de la création de nombreuses choucrouteries nouvelles.

FABRICATION DE LA CHOUCROUTE

Tous les choux pommés, et particulièrement ceux dont les feuilles ont des nervures peu épaisses, peuvent être employés pour faire de la choucroute.

On peut commencer la préparation dès le mois de juillet. Le plus souvent, on attend l'automne.

On arrache les choux en octobre-novembre. On enlève toutes les feuilles extérieures qui ne sont pas bien blanches et on laisse les légumes se ressuyer sous un hangar ou dans une grange. On coupe la tige au ras de la pomme. Au moyen d'une tarière, on enlève autour toute la partie de la tige qui se prolonge dans l'intérieur de la pomme. Pour cette opération, on peut aussi couper le chou en deux.

On passe alors au hachoir pour couper en fines lanières. Ou bien encore on promène les têtes sur une varlope renversée.

On peut aussi employer le dispositif suivant :

Une tablette est placée sur un cuvier. Sur une face de cette tablette se meut d'un mouvement de va et vient une trémie dans laquelle on place les pommes des choux en appuyant sur le tout avec la main. On force ainsi la matière à frotter contre cinq lames en acier fixées sur la tablette, qui ont 0 m. 14 à 0 m. 18 de largeur chacune, et qui laissent entre elles un espace de 2-3 mm. Ces lames tranchantes placées obliquement, réduisent les légumes en copeaux ou rubans, qui tombent dans le cuvier.

Enfin, on vend des machines spéciales pour ce travail.

On met les filaments dans une futaille bien nettoyée, qui vient de contenir du vin blanc, de l'eau de vie ou du vinaigre, et placée dans un lieu abrité contre la gelée. En Allemagne, on emploie des cuves en pierres au lieu de futailles.

On met d'abord au fond, de larges feuilles de choux saupoudrées de sel, puis une couche de 7 à 8 cm de choux,

environ que l'on saupoudre également et sur laquelle on répand quelques feuilles de laurier, des baies de genièvre, du carvi, etc..., environ 40-50 grammes par hectolitre. On tasse ainsi fortement avec un pilon les couches que l'on superpose de la sorte, et que l'on saupoudre chaque fois de sel fin ou à défaut de gros sel gris.

On emploie environ 1 kg de ce dernier pour vingt choux ou par hectolitre de choucroute.

On ne remplit le tonneau qu'à 15 cm. du bord supérieur.

Après avoir tassé fortement, on termine par une couche de sel, puis par des feuilles de choux, sur lesquelles on met un linge humide propre. Sur le tout repose un fond de diamètre, un peu inférieur à l'ouverture du tonneau, et que l'on charge de grosses pierres, bien lavées, ou bien on maintient la pression à l'aide d'une vis, mais elle est alors moins constante.

Un levier à contrepoids est préférable.

Au bout de peu de temps, la saumure formée se montre au-dessus de ce couvercle. Elle se recouvre d'écume, poussée par les gaz de la fermentation acide. On l'enlève et on lave le torchon, puis on ajoute de l'eau salée et bouillie de manière que la choucroute baigne entièrement.

Quelques-uns soutirent le liquide par un trou inférieur et le remplacent par de l'eau salée.

On recommence cette opération quatre ou cinq fois pendant les quinze premiers jours, puis on laisse fermenter la masse, au bout d'un mois la choucroute est faite.

Cependant, quand la fermentation marche régulièrement à 18°-20°, après 15 à 20 jours, on peut commencer à utiliser l'aliment, si l'on n'a pas renouvelé le liquide. La choucroute bien faite est toujours blanche.

Chaque fois que l'on veut en prélever, on enlève les pierres, le fond mobile, puis le linge et enfin le liquide. On essuie ensuite la surface avec une éponge ou un chiffon. Après avoir prélevé la choucroute, on égalise la surface, remplace le linge, le fond mobile et les pierres, préalablement bien lavés. Enfin, on verse quelques centimètres cubes d'eau salée bouillie, le produit devant toujours baigner dans le liquide et aucun vide ne devant exister.

Quand on reste longtemps sans prendre de la choucroute, il faut exécuter ces opérations tous les huit jours

en été, tous les mois en hiver, et vérifier s'il n'y a pas de portions gâtées qu'il faudrait alors enlever.

Chou Quintal (2)

Les variétés de choux les plus employées sont celles dont les feuilles sont lisses, serrées et fines. En Alsace, on cultive spécialement le « Chou Quintal », comme étant celui qui fournit la meilleure choucroute.

Pour obtenir des choux pendant l'hiver, on cultive surtout le chou quintal d'Alsace, les choux Milan de Vertus, et Milan de Pontaise. Ces deux dernières variétés se sèment en mai et leurs produits peuvent être récoltés pendant une bonne partie de l'hiver, car ils se montrent peu sensibles au froid.

Pour ce qui est du chou quintal d'Alsace, cultivé dans cette région spécialement en vue de la production de la choucroute, sa culture est faite un peu différemment en ce sens que le semis doit être fait de très bonne heure, pour la raison que cette variété demande beaucoup de temps pour se développer complètement. La culture en est faite en grand dans presque toute l'Alsace, mais elle est surtout répandue aux environs de Dannemarie et Altkirch.

Le semis se fait à la volée dans le potager, en terre convenable, fumée et profondément labourée. On pratique cette opération dès la fin de février, et si le printemps est sec, on arrose, afin de faciliter la levée.

En avril, on arrache le plant et l'on choisit pour la plantation celui qui est vigoureux et bien constitué.

Celle-ci se fait en terre fumée à raison de 50 mètres cubes de fumier à l'hectare. Un labour profond est nécessaire. La plantation est faite à 0 m. 80 en tous sens. Pour que la reprise se fasse bien, il convient de choisir, si cela est possible, un jour brumeux, succédant à une période de pluie. Dans le courant de l'été, on donne aux choux deux ou trois binages ; ceux-ci sont pratiqués à l'aide de la houe à cheval.

La récolte a lieu à la fin du mois d'octobre et au début de novembre. Les choux sont alors arrachés en saisissant la pomme à deux mains et la faisant tourner sur elle-même, afin de briser toutes les racines. Les pommes sont séparées de la tige à l'aide d'un grand couteau, et toutes les feuilles qui ne sont pas blanches sont enlevées. Celles qui sont complètement vertes sont données aux bestiaux.

DEUXIEME PARTIE

MICROBIOLOGIE DE LA FERMENTATION

CHAPITRE Ier

LES TECHNIQUES D'ISOLEMENT

Ainsi que nous l'indiquions dans l'introduction à notre travail, les microorganismes intervenant dans la fermentation de la choucroute sont assez nombreux, et la première difficulté que nous avons rencontrée a été de les isoler à l'état de pureté.

Voici d'abord les principales méthodes d'isolement (3) valables autant pour les Bactéries que pour les Champignons. Nous indiquerons ensuite celle qui nous a donné les meilleurs résultats.

L'obtention d'une culture pure est la première condition des recherches bactériologiques ; pour étudier la morphologie et la biologie d'un microbe, il faut commencer par l'isoler des autres germes, des impuretés, auxquels il peut se trouver mélangé.

Etant donné les petites dimensions des microbes, on ne peut songer à prélever isolément un de ces êtres pour le reporter dans un milieu de culture ; il faut donc recourir à des procédés plus compliqués. Les méthodes d'isolement employées en bactériologie sont nombreuses ; pour la commodité de l'étude, on peut les ramener à deux groupes. Les premières sont d'ordre purement mécaniques ; elles comportent la dilution et la dissémination ; les secondes utilisent les propriétés biologiques du microbe qu'on se propose d'isoler.

Les procédés du premier groupe conviendront pour isoler chacune des espèces bactériennes que contient un produit donné ; les procédés biologiques, au contraire, s'appliquent spécialement à la recherche de tel ou tel microbe que l'on présume exister dans le produit mis en expérience et dont on connaît à l'avance les propriétés capitales.

Avant tout, quand on veut pratiquer un isolement, il faut distinguer les microbes aérobies des anaérobies stricts ; suivant que l'on se propose d'obtenir les bactéries du premier ou du second groupe, on fera les cultures en présence ou à l'abri de l'air. Dans les cultures à l'abri de l'air, on isolera les différents microbes anaérobies par les procédés que nous étudierons plus loin. Pour le moment, nous nous occuperons uniquement de la séparation des microbes aérobies.

PROCEDES MECANIQUES

1° Dilution dans les liquides

Ce procédé, imaginé par Lister, est peu employé aujourd'hui ; il est très rigoureux, mais a l'inconvénient d'être long et pénible.

Soit à isoler les microbes contenus dans une goutte d'eau. Portons cette goutte d'eau dans un tube contenant dix centimètres cubes de bouillon stérile (tube A) et mélangeons par agitation. Les germes que renfermait la goutte d'eau se trouvent dilués dans les dix centimètres cubes de bouillon ; un centimètre cube correspondant à vingt gouttes, chaque goutte de bouillon contiendra 20×10, c'est-à-dire 200 fois moins de germes que la goutte d'eau mise en analyse. Reportons maintenant une goutte d'eau du mélange (tube A) dans un nouveau tube de bouillon stérile, et répétons cette opération avec un certain nombre de tubes (B, B', B", etc.). Si notre goutte d'eau contenait 200 germes, chaque goutte du tube A contient $\frac{200}{200} = 1$ germe ; ce microbe unique se développera dans chacun des tubes B, B', B", etc., et donnera une culture pure. La goutte d'eau ne contient-elle que 50 germes, un tube sur quatre donnera une culture ; la goutte d'eau renferme-t-elle un plus grand nombre de germes, il sera nécessaire de la diluer davantage, de façon à arriver à un mélange dont une goutte contient au plus un germe ; on portera,

par exemple, dix gouttes du tube A dans un tube de bouillon B, avec une goutte duquel on pratiquera une série d'ensemencements C, C', C", etc.

2° Dissémination

L'isolement des germes par dissémination, imaginé par Koch, exige l'emploi de milieux de cultures solides. Ce procédé peut être utilisé suivant deux modes différents : tantôt l'on ensemence le milieu préalablement liquéfié, tantôt l'on répartit directement les germes à la surface du milieu solide.

Ces procédés permettent d'obtenir des colonies isolées. Théoriquement, chacune de ces colonies provient d'un seul germe et par conséquent constitue une culture pure. En pratique, il arrive fréquemment que les colonies isolées ne sont pas pures. Les microbes d'impureté peuvent être masqués par le développement rapide du germe principal, mais ils reparaissent, et prennent le dessus dans les repiquages ultérieurs ; ce fait s'observe souvent quand on se propose d'isoler les microbes des matières fécales. Il est toujours prudent de pratiquer deux ou trois isolements successifs ; on se met ainsi à l'abri de grossières causes d'erreur.

A) *Dissémination en milieux solides liquéfiés.*

Soit à isoler les germes contenus dans une goutte d'eau. Nous portons cette goutte d'eau dans un tube de gélatine liquéfiée au bain-marie, et nous mélangeons intimement. Les germes de la goutte d'eau se répartissent dans la gélatine ; coulons maintenant cette gélatine en couche mince sur une plaque de verre et refroidissons-la rapidement : les microbes se trouvent disséminés et enrobés dans la couche de gélatine comme les amandes dans la pâte d'un nougat ; si nous exposons la plaque à une température favorable, chaque microbe germera isolément et donnera naissance à une colonie constituée par des individus provenant du germe unique initial et, par conséquent, pure. Il sera aisé, dès lors, de reprendre chacune de ces colonies et de les réensemencer sur des milieux neufs.

La mise en pratique de ce procédé peut être réalisée de différentes façons, mais elle est toujours subordonnée aux règles suivantes :

1. Avant d'ensemencer la gélatine liquéfiée, la laisser refroidir suffisamment (30° à 40°) pour que les germes ne soient pas détruits par la température du milieu.

2. Opérer à l'abri de toute contamination.

3. Placer les plaques à l'abri des poussières atmosphériques.

Boites de Pétri. — Procédé recommandé

Instrumentation. — Trois boîtes de Pétri enveloppées de papier-filtre et flambées au four Pasteur ;

trois pipettes de Pasteur ;

trois tubes de gélatine.

Opération. — 1. Liquéfier au bain-marie la gélatine des trois tubes.

2. Prélever à l'aide d'une pipette Pasteur, en prenant les précautions d'usage, une goutte du liquide dont on veut isoler les germes.

Porter cette goutte dans un tube de gélatine, en observant les règles ordinaires ; replacer le bouchon d'ouate du tube, et assurer le mélange exact en roulant rapidement le tube entre les deux mains et non en agitant le tube de haut en bas : la gélatine produirait ainsi une mousse fort gênante.

3. Avec une nouvelle pipette Pasteur, prélever trois gouttes dans le tube I et les reporter dans le second tube de gélatine liquéfiée (II) ; mélanger comme plus haut.

4. Prélever de même trois gouttes du tube II et les ensemencer dans le troisième tube de gélatine (III).

5. Debarrasser une boîte de Pétri de son enveloppe de papier.

Déboucher purement le tube I, en flamber l'orifice dans la flamme d'un bec de Bunsen. Soulever le couvercle de la boîte de Pétri, couler la gélatine dans la boîte, replacer rapidement le couvercle. Communiquer quelques oscillations à la boîte pour étaler la gélatine en couche uniforme, puis déposer la boîte sur une surface horizontale et froide et laisser la solidification se produire. Cela fait, étiqueter et placer à l'étuve à 20°, couvercle en bas.

6. Opérer de même pour les tubes II et III.

7. Examiner chaque jour les boîtes, noter le développement des colonies, leurs caractères (examen à l'œil nu ou à la loupe à travers la paroi de verre de la boîte) ; enfin prélever avec une öse un échantillon de chaque colonie pour les examens microscopiques et les réensemencements.

Remarque. — Cette méthode présente des inconvénients et ne peut être appliquée dans tous les cas.

a) Certains microbes liquéfient rapidement la gélatine ; l'isolement se trouve ainsi compromis et interrompu.

b) Elle ne convient qu'aux bactéries cultivant à des températures inférieures à 25°, la gélatine se liquéfiant au-delà.

Aussi a-t-on recours, dans certains cas, et particulièrement pour la recherche des bactéries pathogènes, aux plaques préparées avec la gélose. Ce procédé ne donne jamais que des résultats médiocres ; il est préférable, lorsqu'il est nécessaire de pratiquer l'isolement sur gélose, d'avoir recours à l'ensemencement en surface.

Pour la préparation des plaques de gélose, on opère comme pour la gélatine, en tenant compte des observations suivantes :

1. La gélose solidifiée ne se liquifie qu'entre 60° et 100°, mais elle reste liquide jusqu'à +40°. Les tubes de gélose seront donc liquifiés dans l'eau bouillante, puis on les laissera refroidir jusqu'à ce que leur température soit aisément supportée par la main.

2. Ensemencer alors les tubes comme il a été dit plus haut, mais opérer très rapidement la confection des boîtes, sans quoi la gélose se solidifierait et formerait des grumeaux.

Il est bon, pour éviter la production des grumeaux lors du refroidissement dans les boîtes, de placer celles-ci, avant d'y verser la gélose, sur une platine contenant de l'eau à 40°-45° et de ne laisser refroidir que progressivement.

3. Placer les boîtes à l'étuve à 37° ; pour empêcher la dessiccation de la gélose, disposer les boîtes dans une chambre humide constituée par un cristallisoir à cloche, dans le fond duquel on dispose une feuille de papier-filtre humectée d'eau.

On pourrait opérer de même avec l'agar-gélatine pour les cultures devant être maintenues entre 25° et 35°.

Observation importante. — Quand on porte à l'étuve des boîtes de Pétri, les placer couvercle en bas de façon que l'eau de condensation ne se collecte pas à la surface du milieu de culture en nuisant à la pureté de l'isolement.

B) *Dissémination à la surface des milieux solides.*

Quand on désire isoler les microbes contenus dans un corps solide tel qu'une fausse membrane, un crachat visqueux, etc., on badigeonne avec une parcelle de ce corps la surface d'un milieu nutritif solide, disposé soit en plaque, soit en tube incliné. Ce procédé, classique aujourd'hui pour l'isolement du *Bacille diphtérique* dans les fausses membranes, permet d'utiliser, pour l'isolement, des milieux nutritifs non liquéfiables par la chaleur : pomme de terre, serum, par exemple.

Si l'on suppose que le produit à étudier est très riche en germes (matières fécales, par exemple), on en dilue une parcelle dans quelques centimètres cubes de bouillon ou d'eau stérile, et c'est avec un peu de cette émulsion que sont pratiqués les ensemencements.

On peut opérer suivant deux méthodes différentes.

a) *Ensemencement en stries* :

Nous prendrons comme type un isolement sur plaque de gélose.

Instrumentation. — Öse de platine avec fil moyen ou fort :

Un tube de gélose ;

Une boîte de Petri stérilisée.

Opération. — 1. Liquéfier la gélose et la couler dans la boîte de Petri en observant les règles formulées plus haut. Laisser la gélose se solidifier complètement.

2. Prendre alors avec l'öse une parcelle du produit à ensemencer. Soulever le couvercle de la boîte de Petri, porter l'öse sur la surface de la gélose et couvrir celle-ci d'une série de stries rectilignes, éloignées de quelques millimètres l'une de l'autre, sans recharger l'öse.

A chaque strie, l'öse abandonne un peu de la semence qu'elle porte avec elle ; on conçoit que bientôt les stries ne seront plus ensemencées qu'avec un très petit nombre de microbes.

3. La boîte étant portée à l'étuve à 37°, couvercle en bas, les colonies se développent très abondantes au niveau des premières stries et de plus en plus rares et bien isolées au niveau des dernières.

b) *Ensemencement en surface* :

1. *Procédé classique.* — Nous décrirons un isolement sur serum incliné ; opérer de même sur gélose, sur pomme de terre, etc...

Instrumentation : Öse fort aplatie en palette ;
trois tubes de sérum solidifié incliné.

Opération : 1. Prélever avec l'öse une petite quantité du produit à ensemencer.

2. Déboucher purement un tube de sérum, porter l'extrémité de l'öse sur la partie la plus reculée de la surface du sérum, puis la ramener vers l'orifice du tube en la promenant transversalement, de manière à badigeonner toute la surface du milieu de culture (tube I).

3. Reporter immédiatement l'öse, sans la recharger, sur le second tube et opérer comme en 2 (tube II).

4. Répéter l'opération sans changer l'öse, sur le troisième tube (tube III).

5. Placer les tubes à l'étuve à 37°.

Au cours de ces opérations, l'öse s'essuie peu à peu et se dépouille progressivement des microbes dont elle était chargée : sur le tube I se développeront des colonies nombreuses et confluentes ; mais les colonies seront de plus en plus rares et bien isolées sur le sérum des tubes II et III ; c'est sur ces deux derniers tubes qu'on les observera.

Dans ce procédé, on peut remplacer des tubes par des boîtes de Petri ou de Pinoy.

2. — *Procédé de Veillon* :

1. On charge l'öse d'une petite quantité du produit à ensemencer.

2. On porte successivement l'öse, sans la recharger, dans l'eau de condensation de quatre à six tubes de gélose.

3. Les tubes rebouchés, on les incline de façon que l'eau de condensation vienne se promener à la surface de la gélose et l'ensemencer. Puis on porte les tubes à l'étuve en position verticale.

PROCÉDÉS BIOLOGIQUES

Les méthodes d'isolement basées sur les propriétés biologiques des microbes ne peuvent être employées que lorsqu'on se propose de rechercher et d'isoler un germe donné ; on utilise alors certaines propriétés, connues à l'avance, de ce germe pour placer celui-ci dans des conditions propices à son développement et défavorables à la culture des autres microbes qui existent avec lui dans la semence. La séparation des aérobies et des anaérobies stricts rentre dans cette catégorie de procédés d'isolement : ici l'on utilise la propriété qu'ont les aérobies de ne pouvoir se passer d'oxygène libre pour les éliminer dans les cultures faites à l'abri de l'air.

Nous décrirons les procédés les plus fréquemment utilisés.

Destruction par la chaleur des germes coexistants

Les bactéries non sporulées périssent rapidement quand elles sont exposées en milieu liquide à une température voisine de 60° ; au contraire, les microbes pourvus de spores supportent pendant plusieurs minutes des températures de 80° à 100°, et même 105°.

Il sera facile, dès lors, de séparer une bactérie sporulée d'un mélange où entrent des microbes non sporulés ; il suffira de soumettre pendant quelques minutes le mélange à une température comprise, suivant la résistance de la spore à isoler, entre 80° et 105°, puis de l'ensemencer dans un tube de bouillon. C'est ainsi qu'on peut purifier une culture impure de *B. anthracis*, D. Avaine, en l'exposant pendant cinq minutes à une température de 80° à 85°, l'infusion de foin, portée dix minutes à l'ébullition, donnera une culture pure de *B. subtilis*. Ehrenberg.

Pour utiliser ce procédé, il faut avoir soin de toujours opérer avec un mélange liquide, les microbes desséchés ou protégés par des particules solides résistant beaucoup mieux à l'action de la chaleur ; de plus, il faut veiller à ce que toutes les parties de la culture soient soumises à la température choisie, sans quoi quelques bactéries pourraient échapper à l'action destructive de la chaleur, et l'opération ne donnerait aucun résultat.

On opérera de la façon suivante :

1. Préparer une pipette Pasteur étranglée au-dessous de l'ouate. Cette pipette doit être de petit diamètre.

2. Aspirer la culture de façon à remplir la pipette jusqu'à l'étranglement, sceller dans une petite flamme l'effilure et l'étranglement.

3. Immerger complètement le tube clos ainsi préparé dans un bain-marie porté à la température choisie ; maintenir cette température cinq à dix minutes suivant le cas, puis retirer le tube (pour les températures supérieures à 100°, se servir de l'autoclave).

4. Essuyer le tube, flamber et briser entre les mors d'une pince une de ses extrémités, aspirer purement un peu de son contenu dans une pipette stérile et pratiquer les ensemencements définitifs.

Cultures à la température optima et cultures fractionnées

Certains germes se développent à toutes les températures comprises entre +10° et +40°, mais la plupart des microbes présentent des températures limites de culture beaucoup moins élastiques ; c'est ainsi qu'un grand nombre de saprophytes poussent mal et lentement au-dessus de 30° ; au contraire, beaucoup de Bactéries pathogènes présentent leur maximum de développement entre 30° et 40°, certaines ne pouvant cultiver au-dessous de 30° ; d'autres encore se développent à 43°, température qui arrête la multiplication de la plupart des microbes, (température dysgénésique). On applique ces propriétés à l'isolement des germes. On peut, par exemple, isoler le *Bactérium coli* Escherich des matières fécales en ensemençant celles-ci dans un tube de bouillon maintenu à 43° : le *Bactérium coli* et le *Bacille typhique* Eberth à peu près seuls se développent dans ces conditions. Mais ce procédé ne donne pas du premier coup une culture pure : les germes qui coexistaient avec le *Bactérium coli* dans la semence n'ont pas été détruits ; ils ne se sont pas développés tant que la culture est restée à 43°, mais ensemence-t-on un peu de cette culture dans un tube de bouillon maintenu à 37°, ils trouveront des conditions favorables à leur développement et envahiront le bouillon. Pour les éliminer complètement, il faut recourir aux cultures fractionnées ; dès que le bouillon du premier tube exposé à 43° est trouble, on en prélève avec une öse une trace au moyen de laquelle en ensemence un tube (II) que l'on expose aussi à la température de 43°. Ce tube (II) servira à ensemencer de même un nouveau

tube (III) ; après plusieurs passages ainsi répétés, on obtient une culture pure.

De tous ces procédés, celui qui nous a donné les meilleurs résultats, est l'isolement sur boîte de Petri.

Etant donné que les organismes que nous voulons isoler vivent à la température ordinaire, nous avons fait toutes nos cultures entre +18° et +20°. Dans un premier temps, nous avons cherché à obtenir les organismes vivant sur la feuille du chou même. A cet effet, nous avons mis en macération dans l'eau salée, en présence de très peu d'air (ainsi que cela a lieu dans la fermentation de la choucroute) des fragments de feuilles de chou non lavés. Au bout de 24 heures, on observe un début de fermentation : nous prélevons une goutte de liquide que nous étalons sur boîte de Petri suivant le procédé indiqué plus haut.

Dans un deuxième temps, nous avons isolé les organismes vivant dans le jus de choucroute, produit acide dû à la fermentation et à cet effet nous avons ensemencé directement sur boîte de Petri, toujours suivant la technique précédante, quelques gouttes d'un jus de fermentation déjà assez âgé.

Le résultat de ces isolements est exposé dans le chapitre suivant consacré à l'étude morphologique, biologique et physiologique de chacun des organismes isolés.

CHAPITRE II

ORGANISMES SUSCEPTIBLES D'INTERVENIR DANS LA FERMENTATION DE LA CHOUCROUTE

Ainsi qu'on le sait depuis longtemps, la part essentielle des transformations donnant le produit connu sous le nom de choucroute, revient à la fermentation lactique. En 1901 déjà, Duclaux (4) écrit en effet « la fermentation lactique a par elle-même, et au point de vue théorique une importance très grande. Au point de vue pratique, elle commande presque toutes les opérations de la laiterie, un certain nombre de grandes industries, telles que celles de la distillerie, la préparation de certains aliments fermentés comme la choucroute ». Et il ajoute : « Par son côté utilitaire, elle peut être placée à côté de la fermentation alcoolique. Mais elle n'en a pas la belle simplicité d'allure. Les phénomènes y sont en apparence plus simples ; mais nous allons voir qu'au fond ils sont plus compliqués, que les êtres qui les produisent sont plus variés que les levures et aussi plus difficiles à étudier.

C'est précisément l'ensemble de ces êtres que nous allons chercher à connaître en nous aidant des très nombreux travaux parus à ce sujet ; puis en indiquant dans le chapitre suivant lesquels il nous a été possible d'identifier dans le cas qui nous occupe, ou dont la présence au moins, nous a paru indispensable pour expliquer les phénomènes qu'il nous a été donné d'observer.

Le premier organisme en date est celui découvert par Pasteur et qu'il nomma « *ferment lactique* ». Au microscope, il se présente sous forme de tous petits articles immobiles, étranglés en leur milieu de 1 μ 6 de diamè-

tre, ayant parfois la forme du « *Mycoderma aceti* » quelquefois plus aminci. Quand ils vieillissent, ils semblent se disloquer, se rapetisser et s'étalent en amas confus n'ayant en apparence rien de vivant.

Le deuxième ferment mis en évidence fut celui auquel Huppe (5) donna le nom « *Bacillus Acidi Lactici* ». Il a isolé cet organisme de lait aigri : il se présente sous forme de courts bâtonnets immobiles ayant 1 μ à 1 μ 7 de longueur, 0 μ 3 à 0 μ 4 de largeur, d'ordinaire par couples, quelquefois, mais plus rarement en chaîne de quatre.

Mais l'acide lactique peut être produit par toute une série d'autres microorganismes, dont voici la liste, avec indication rapide pour chacun.

Le Bacillus orthobutylicus Grimbert en produit, mais en très faibles quantités.

Le Cacillus Butyricus de Botkin se rencontre dans le lait. C'est un anaérobie absolu se présentant sous forme de petits bâtonnets de 1 μ à 3 μ de longueur, ne donnant pas de spores dans les milieux sucrés. Dans les milieux amylacés par contre, la sporulation est très rapide. Sur bouillon sucré, il donne de l'acide butyrique et de l'acide lactique inactif avec de faibles quantités d'acide propionique, acétique et formique.

Le Bacillus saccharobutyricus de Klecki a été rencontré dans un fromage. Il est également anaérobie presque strict. C'est un bâtonnet de 5 μ à 7 μ de long, de 0 μ 7 de large, ordinairement isolé, rarement par files. Il attaque le lactose pour donner surtout de l'acide butyrique.

Le ferment butyrique de Fitz est un bacille assez large et trapu de 2 μ de large sur 5 μ à 6 μ de long Il fermente le sucre, la mannite et la glycérine en produisant de l'acide butyrique, de l'acide lactique et de l'acide succinique.

Le ferment mannitique de Gayon et Dubourg (6) : anaérobie facultatif présente une particularité ; il peut donner naissance dans son action sur le sucre à des molécules plus simples, telles qu'acide lactique, acide acétique, mais il peut aussi créer des molécules plus compliquées, telle que la mannite, par exemple. Ce ferment a été retiré d'un vin d'Algérie. Il se présente sous forme de bacilles très courts, immobiles, qui, au lieu de rester disséminés dans le liquide, ont tendance à se grouper. Il tombe au fond du récipient où il forme une couche légère continue,

d'un aspect blanchâtre. Il fermente de nombreux sucres : celui qu'il préfère est la lévulose, à partir duquel il donne de la mannite, de la glycérine, de l'acide lactique, acétique et carbonique. La proportion de mannite formée peut varier de 5 à 72% de lévulose formée ; elle diminue lorsque l'acide lactique augmente, celui-ci agissant comme un véritable antiseptique vis-à-vis du ferment.

Le bacillus lactis aérogénes découvert par Escherich, en 1886, ressemble assez morphologiquement au *Pneumobacille de* Friedländer. Il est immobile, mesure 1 μ. 5 à 2 μ. de longueur, ne se colore pas par la méthode de Gram, ne donne pas de spores, s'entoure d'une capsule dans le pus et le sang des animaux inoculés. Il coagule le lait, par acidification, sans redissoudre la caséine. Il fermente le glucose, la saccharose, le lactose, la mannite, la dextrine et la glycérine, en produisant de façon à peu près constante de l'alcool, de l'acide acétique lactique et succinique.

Le Colibacille : isolé pour la première fois par Escherich en 1885 est trop connu pour rappeler sa morphologie. Indiquons seulement qu'il fermente la plupart des sucres en donnant naissance surtout à de l'acide lactique, acétique et un peu de formique.

Enfin, le *Saccharobacillus Pastorianus* Van Loer (7) isolé d'une bière tournée, se présente sous forme de bâtonnets articulés et formant chaîne, de longueurs variables, d'un diamètre de 1 μ environ. Il est anaérobie indifférent et préfère les milieux alcalins. Il s'attaque aux maltose, saccharose et glucose surtout, en produisant des acides fixes, notamment de l'acide lactique inactif.

Tels sont donc les organismes susceptibles de produire de l'acide lactique à partir de glucides. Il reste à savoir maintenant quels sont ceux capables de former ces glucides à partir de la cellulose du chou, car les organismes précédents sont incapables de s'y attaquer directement.

Mitscherlisch (8) a observé le premier, en 1850, le mécanisme de la dissolution de la cellulose dans les macérations végétales. Le phénomène a de nouveau été étudié par Trecul (9) en 1865, qui a donné aux organismes responsables de cette action, le nom d' « *amylobacter* ». C'est Van Tieghem (10) qui en paracheva l'étude. Ensemencé sur milieu nutritif convenable, ce bacille se reproduit activement par allongement et segmentation transversale. Dans le protoplasme, apparaît une formation transition de matière amylacée. *L'amylobacter* se nour-

rit aussi bien aux dépens du sucre que de la cellulose, ainsi que le montre l'expérience suivante : si dans une fermentation de glucose en activité, se faisant sous l'action des *B. amylobacter*, Van Tieghem, on introduit quelques tranches minces de radis, ils restent inaltérés tant qu'il y a du sucre, tandis que dans l'eau pure, elles se désagrègent et se dissolvent rapidement sous l'action de ces mêmes *B. amylobacter* qu'elles ont rencontrés dans le liquide sucré. Si on attend que le sucre ait disparu, les mêmes tranches disparaissent en quelques heures. Ceci prouve que le sucre est un meilleur aliment pour l'*amylobacter* que la cellulose. D'autre part, l'*amylobacter* Van Tieghem n'agit pas de la même façon sur toutes les celluloses. Le bacille enfin est un anaérobie ; l'air nuit à son développement. Il fermente la cellulose avec production d'acide carbonique, d'hydrogène et d'acide butyrique dont l'accumulation finit par empêcher l'action du bacille.

Enfin Omeliansky (11) a recherché l'agent ou l'un des agents de la fermentation d'une cellulose très résistante, celle qui constitue le papier-filtre. Il l'a décrit ainsi : c'est un bacille extrêmement mince et tenu à articles droits ou légèrement sinueux, longs de 4 μ à 8 μ, larges de 0 μ, 3 à 0 μ, 5. Il forme des spores très régulièrement rondes. Il ne fermente que les celluloses analogues à celles que l'on trouve dans la pâte à papier et n'agit sur aucun sucre. Dans cette fermentation, il se forme du gaz carbonique, de l'hydrogène, de l'acide acétique et butyrique et un peu d'acide valérianique.

Tels sont donc, à peu près au complet, les organismes susceptibles d'entrer en ligne de compte dans le phénomène que nous nous sommes proposés d'étudier.

Indiquons maintenant, dans le chapitre suivant, ceux qu'il nous a été possible d'isoler, ou dont la présence paraît indispensable pour expliquer la présence de certains corps.

CHAPITRE III

LES ORGANISMES ISOLÉS DU JUS DE CHOUCROUTE LES CRISTAUX DE MANNITOL

Précisons d'abord que nous sommes partis d'un jus où la fermentation était arrivée à un stade déjà assez avancé. Ce jus a été recueilli dans plusieurs ballons stériles, bouchés au coton. Il renfermait des débris de cellulose assez importants.

Nous en avons prélevé quelques gouttes pour les ensemencer sur divers milieux : bouillon ordinaire, bouillon sucré, eau peptonée, gélose, carotte, pomme de terre. Les uns ont été mis à l'étuve, les autres abandonnés à la température du laboratoire. Au bout de 24 heures, nous avons constaté un développement abondant sur bouillon, alors que l'eau peptonée n'en a rien donné. Sur carotte, il s'est formé un enduit blanc.

Examiné au microscope, le bouillon s'est révélé contenir un mélange d'un certain nombre d'organismes qu'il fallait isoler. La culture sur carotte, par contre, avait l'aspect d'une culture pure : repiquée sur gélose glucosée, elle a donné naissance au bout de 3 à 4 jours, à la température ordinaire, à des colonies rondes, blanches, de un centimètre de diamètre environ, présentant un centre surélevé, duquel partent de fines stries rayonnantes. Examinée au microscope, une pareille colonie se montre formée d'un grand nombre d'éléments courts, trapus, cylindriques.

Les éléments proviennent de la fragmentation d'un Mycelium présentant un thalle irrégulièrement cloisonné, la longueur des articles diminuant à mesure que l'on se rapproche des extrémités. Chaque filament se ramifie

en branches latérales naissant au-dessous d'une cloison et ne se développant, le plus souvent que d'un côté de l'axe. Les conidies n'apparaissent que lorsque l'accroissement du thalle est terminé.

Cet organisme pousse bien sur tous les milieux sucrés et aussi sur l'acide lactique.

Sur une portion de jus de choucroute que nous avons abandonnée dans une fiole cônique, un certain temps à elle-même, il s'est formé un voile qui, examiné au microscope, s'est montré formé du même organisme que celui que nous venons de décrire : il s'agit donc bien d'une de ces moisissures qui se développent au détriment de l'acide lactique formé, et que l'on considère comme un mal inévitable dans cette fermentation. Ces caractères nous ont permis de conclure à la présence de l'*Oïdium lactis* Frésenius que l'on trouve dans les jus acides, souvent associé à d'autres levures. Il nous a été possible d'isoler une de ces levures, en utilisant la méthode des dilutions sur boîte de Petri, indiquée dans le chapitre précédent. Puis, en ensemençant l'organisme ainsi isolé sur milieu sucré tamponné au carbonate de calcium. A la température ordinaire, il se forme un voile à la surface du milieu de culture, au bout de 24 à 48 heures. Examiné au microscope, ce voile se montre formé d'un grand nombre de petits éléments ronds de 4 μ à 6 μ de largeur sur 5 μ à 8 μ de long au plus, souvent ovoïdes. Repiqué sur gélose nutritive, ils donnent un enduit crémeux, envahissant tout le milieu au bout de deux jours, à la température ordinaire. Les éléments ont le même aspect sur milieu solide que liquide. Le simple examen microscopique montre qu'il s'agit de Levures. Etant donné qu'elles vivent en surface, ce ne sont pas des levures-ferments : en effet, la plupart des levures se développant en voile, sont incapables de donner lieu à une fermentation. Elles vivent d'habitude en symbiose avec des Bactéries, notamment les *Bactéries lactiques* qui attaquent une partie du glucose pour donner de l'acide lactique : ce corps sert à son tour d'aliment à la Levure. Or, c'est ce que nous avons pu constater avec l'organisme que nous décrivons. Nous basant par ailleurs sur une note de M. Lanzenberg (12), nous l'avons identifié comme étant un *Saccharomyces Mycoderma*. Voici en effet ce qu'écrit cet auteur : « Il est fréquent de voir la surface des liquides contenant de l'acide lactique (lait sûri, macération de choucroute) se recouvrir de colonies microbiennes. L'apparition de ces microorganismes coïncide avec une rapide

diminution de l'acidité de ces liquides. De la zooglée qui recouvrait une macération de choux, il a pu isoler l'*Oïdium Lactis* et deux levures « *Saccharomyces mycoderma I* » et « *Saccharomyces mycoderma II* ». En cultivant séparément chacune de ces espèces sur une macération stérilisée, puis additionnée d'acide lactique, l'auteur a pu se rendre compte que chacune d'elles détruit avec rapidité cet acide.

En ce qui nous concerne, nous n'avons reconnu qu'une seule espèce de *Saccharomyces* dans notre macération, mais l'observation précédente concorde bien avec le fait que nous avons trouvé également l'*Oïdium Lactis*.

Jusqu'à présent donc, nous avons décrit des organismes se nourrissant aux dépens de l'acide lactique. Il nous reste à mettre en évidence ceux qui le forment. Dans la liste des ferments que nous indiquions précédemment, nous avons vu qu'il en était qui préféraient l'anaérobiose, d'autres étant au contraire aérobies, d'autres enfin indifférents. C'est parmi ces deux groupes que se rangent ceux que nous avons identifiés : nos cultures, en effet, ont été faites en présence d'oxygène. Il en est un que ses propriétés morphologiques nous ont permis de reconnaître immédiatement. Ce sont des bâtonnets de 2 μ à 3 μ de long sur 0 μ 6 à 0 μ 7 de large, droits, à bouts arrondis, ne prenant pas le Gram, mobiles, mais assez peu, jamais accompagnés de spores. Ensemencés sur divers milieux sucrés, lactose, glucose, levulose, galactose, mannite, ils les font tous fermenter avec production d'acide lactique. Tous ces caractères nous ont permis de reconnaître dans cet organisme le *Bacille coli* Escherich qui est l'un des agents principaux de la fermentation lactique, comme nous le disions dans le chapitre précédent. Associé à lui, nous avons observé la présence constante de *coco-bacilles*, de taille inégale en moyenne 1 μ, 5 le plus souvent par deux, ne prenant pas le Gram et immobiles. Ce bacille ressemble extrêmement au *Pneumobacille* : il ne peut s'agir que de l'espèce décrite par Grimbert et Legros, Derry et Martin, sous le nom de *Bacillus lactis aérogènes* (13).

Enfin, toujours en opérant par la méthode d'isolement sur boîte de Petri, nous avons pu obtenir des colonies d'aspect blanc grisâtre, qui, repiquées à l'état pure, se sont développées en forme de colonies étoilées d'aspect typiques. Examinées au microscope, elles se sont montrées formées de grands bacilles droits ou légèrement incurvés, à bouts arrondis, prenant le Gram, et donnant

des grandes spores : il s'agit là, sans nul doute, d'une espèce saprophyte, ne jouant pas de rôle dans la fermentation lactique proprement dite. Tous ces caractères sont en effet ceux du *Bacillus Megaterium*.

Enfin, il nous restait à caractériser un élément bacillaire très court, immobile et ayant tendance à se grouper en amas. Cette description coïncide avec celle que Dubourg et Gayon ont donnée du ferment mannitique. Or, voici ce que nous avons constaté. Nous avions abandonné un reste de jus de fermentation dans un ballon bouché avec un bouchon de liège. Peu à peu la surface du liquide, s'est recouverte d'un voile devenant de plus en plus épais. Au bout d'un mois, nous avons examiné ce voile au microscope ; en dehors des levures décrites précédemment et de nombreux éléments bacillaires, nous avons été frappés par la présence de grands cristaux, très bien formés, ayant l'aspect de prismes orthorhombiques souvent agglomérés-radiés, tels que les montre la figure ci-dessous :

Or cet aspect cristallin caractérise le mannitol

$$\begin{array}{cccccccc} CH^2 & - & CH & - & CH & - & CH & - & CH & - & CH^2 \\ | & & | & & | & & | & & | & & | \\ OH & & OH & & OH & & OH & & OH & & OH \end{array}$$

qui s'était formé en telle abondance dans notre milieu qu'il s'est déposé sous forme de cristaux. Il ne s'est formé que tardivement, car aussi longtemps que notre milieu renfermait de l'acide lactique, le ferment mannitique se développe mal. Ce n'est qu'à la disparition de celui-ci, que le ferment mannitique qui vit aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose, peut

transformer le sucre en mannitol. C'est donc en nous basant sur la présence de ce corps, présence indubitable comme le prouve l'existence des cristaux que nous avons pu reproduire d'après nature, que nous avons conclu à l'existence du ferment mannitique dans le jus de choucroute.

Nous montrerons à la fin de notre travail, comment nos observations s'enchaînent pour expliquer la présence de ces divers corps.

Nous avons vu jusqu'à présent quels organismes attaquent l'acide lactique, et comment celui-ci est produit à partir des sucres. Il restait à chercher l'origine de ces sucres, ou plus exactement à préciser quels organismes leur donnent naissance à partir de la cellulose seule source possible pour obtenir des glucides ? Mais nous avons vu que la plupart de ces organismes sont anaérobies. Rappelons, d'autre part, que les premiers stades de la fermentation de la choucroute se font en absence d'oxygène ; il suffit de se reporter à la fabrication de cet aliment, telle que nous l'avons décrite dans la première partie de ce travail, pour s'en apercevoir. Les feuilles de choux, étroitement comprimées, tassées les unes contre les autres dans un baril, recouvert d'une planche chargée de poids, ne sont pas en contact avec l'oxygène de l'air. C'est à la faveur de ces conditions que se fait la première attaque. Il est donc compréhensible que dans le jus de choucroute, ayant passé à l'air, nous ne retrouvions pas ces organismes.

Il nous a été donné toutefois, d'identifier dans les divers échantillons de jus, des ferments butyriques, facilement reconnaissables à leurs longues formes presque filamenteuses. Les organismes peuvent vivre en présence d'air, et l'attaque de la cellulose se fait en présence ou en absence d'oxygène : c'est ce qui se produit, par exemple, dans un ballon renfermant du jus de choucroute et des débris de cellulose, le tout étant bien bouché. Dans ces conditions, les ferments butyriques s'attaquent au ciment pectique, aux cadres cellulosiques, détruisent l'amidon et les autres sucres pour libérer des molécules de glucides simples, telles que glucose et lévulose. Nous avons donc là l'explication de l'origine de ces sucres nécessaires à la vie des organismes précédemment décrits.

Pour nous résumer et conclure ce chapitre, voici les principaux organismes que nous avons décelés dans le jus de fermentation de la choucroute.

1. Des champignons, susceptibles de vivre aussi bien en anaérobiose qu'en aérobiose : *Oïdium Lactis* et *Saccharomyces mycoderma.*

2. Des bactéries ne vivant qu'en présence d'oxygène : *Colibacille*, *Bacillus Lactis aerogenes*, *Bacillus megatérium* vivant en saprophytes.

3. Des bactéries anaérobies facultatives enfin, telles que le *ferment mannitique* et les *bactéries butyriques.*

Quels sont les produits auxquels ces divers organismes vont donner naissance ? Dans quelles conditions les uns ou les autres se développeront-ils de préférence ? C'est ce que nous allons exposer dans la partie suivante de ce travail.

TROISIEME PARTIE

BIOCHIMIE de la FERMENTATION

CHAPITRE Ier

LES COMPOSÉS APPARAISSANT A UN STADE AVANCÉ DE LA FERMENTATION

Nous avons commencé notre étude par le stade avancé, car c'est lui qui caractérise le produit commercial prêt à être consommé. Nous nous sommes, en effet, placés tout d'abord à un point de vue strictement pratique en cherchant à déceler dans une macération de choucroute âgée de 2 mois, les composés organiques auxquels on peut logiquement attribuer le goût particulier qu'acquiert le produit de fermentation du chou. Ces composés sont d'ailleurs encore en voie d'évolution, ainsi que nous le montrerons et sont loin de représenter les dérivés ultimes de la dégradation. Mais là nous rejoignons le problème théorique du mécanisme complet de la fermentation depuis le stade initial cellulose jusqu'aux composés les plus simples, comme le gaz carbonique et l'eau.

Voyons donc quels sont les corps qu'il nous a été possible de caractériser dans un jus de fermentation âgé. Précisons, en passant, que tous nos prélèvements ont été faits stérilement pour ne pas introduire dans le milieu d'autres organismes susceptibles de modifier le cours de la fermentation. Deux réactions préliminaires nous ont

immédiatement renseignés sur les points suivants : le jus présente une réaction nettement acide, et il réduit fortement la liqueur de Fehling et le nitrate d'argent ammoniacal. Nous avons commencé par caréctériser les substances réductrices. Comme il s'agit vraisemblablement d'un sucre réducteur, nous avons recours à la méthode des hydrazones pour l'identifier. Sur une lame, on porte une goutte de phenylhydrazine en solution glycérinée, puis une goutte d'acétate de sodium au dixième, en solution également glycérinée, enfin une goutte de jus de choucroute. On recouvre d'une lamelle, et on porte le tout au bain-marie pendant deux heures. Au bout de ce temps, l'osazone a cristallisé. Examinée au microscope, elle montre des amas en branches de genêts, ou d'autres en épis, toutes dispositions caractéristiques des deux sucres épinières glucose et lévulose. Il reste à préciser en présence duquel de ces deux sucres nous nous trouvons. La réaction de Selivanoff permet de les caractériser (15). Dans un tube à essai, on met 2 centimètres cubes de réactif résorcinique, 2 centimètres cubes de jus de choucroute, on ajoute, 2 centimètres cubes de HCl concentré, on mélange et on porte le tout au bain-marie bouillant. On laisse deux minutes en contact. La présence de lévulose se décèle par l'apparition d'une couleur rouge plus ou moins intense, laquelle s'accompagne de la formation d'un précipité de même teinte. L'addition d'un égal volume d'alcool amène la disparition du précipité et le liquide devient d'un beau rouge. Comme cette réaction a été positive, nous avons, comme sucres réducteurs, dans le jus de la fermentation, le glucose et le lévulose.

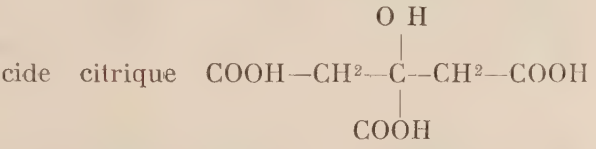
Mais il pourrait y avoir en plus des polyholosides n'agissant pas sur la liqueur de Fehling, notamment du saccharose. Pour nous en assurer, nous avons dosé dans un premier temps le glucose sur le jus filtré. Il en renferme 10,85 grammes pour mille. Dans un deuxième temps, nous traitons 50 centimètres cubes de jus de choucroute par 1 centimètre cube d'acide chlorhydrique au dixième, on porte pendant vingt minutes au bain-marie. Après refroidissement, on ramène le volume à 50^{cc} et on dose le sucre à nouveau. Le liquide renferme 10,9 grammes pour mille ; ce qui prouve qu'il n'y a pas eu augmentation des sucres par hydrolyse, c'est-à-dire qu'il n'y avait pas de di- ou de tri-holosides.

Nous n'avons pas cherché les pentoses, ni les tetroses, ces corps ne semblant pas jouer un grand rôle, même s'ils existent, dans la fermentation. Il n'en est pas de

même du triose qu'est la glycérine. Mais la parenté de ce corps avec certains intermédiaires, dont nous indiquons la présence dans le chapitre suivant, nous le fera caractériser avec ces derniers.

Cherchons maintenant à connaître la nature des produits acidifiant le jus. Il ne peut s'agir que d'acides organiques ayant pris naissance dans la décomposition des sucres.

Une réaction préliminaire va orienter nos recherches. C'est celle de Berg : du jus de choucroute, fortement dilué et à peu près incolore, est additionné de quelques gouttes de réactif de Berg ; il se développe une coloration jaune intense, révélant la présence d'acides alcools. Munis de cette indication, nous avons commencé par rechercher l'acide citrique



On porte à l'ébullition 5^cc de jus de choucroute après l'avoir mélangé avec 1^cc de sulfate mercurique acide, puis retirant du feu, on ajoute quelques gouttes de permanganate de potassium à 2%. Le jus commence à se décolorer et aussitôt après, il se forme un trouble. Par conséquent, il y a présence d'acide citrique.

Un autre acide — acide alcool susceptible de se trouver dans la macération est l'acide lactique $CH^3—CH(OH)—COOH$.

Mais si nous voulons le caractériser au réactif de Berg, il est nécessaire d'éliminer d'abord l'acide citrique. A cet effet, nous opérons de la façon suivante : Dans un becher, on met 50^cc de jus de choucroute, puis 3 grammes de carbonate de calcium, puis 50 centimètres cubes d'acide chlorhydrique à 4,5% jusqu'à dissolution du carbonate. On porte le tout au bain-marie pendant une heure. Il se forme un précipité que nous caractériserons tout à l'heure. Le citrate de calcium ne précipite pas encore dans ces conditions. On filtre et on sature le filtrat d'ammoniaque. On reporte au bain-marie pendant une heure : il se forme un précipité floconneux très fin, d'aspect colloïdal qui est constitué par du citrate tricalcique. Il reste en solution l'acide lactique. Pour le caractériser, nous avons encore une fois recours à la réaction de

Berg : elle est positive. Mais cette réaction n'étant pas spécifique, nous avons essayé de mettre en évidence la fonction alcool. Pour cela, on traite à l'ébullition 5 cc du filtrat débarrassé d'acide citrique, par 1 cc. d'acide sulfurique au 1/10e et par du permanganate de potasse à 1%, jusqu'à légère teinte rose. On élimine l'excès de MnO^4K par une quantité strictement suffisante d'oxalate de potassium. L'oxydation permanganique dans ces conditions a transformé la fonction alcool en fonction aldéhyde. Celle-ci est mise en évidence par le réactif de Schiff ; la fuchsine bisulfitée se recolore effectivement sous l'action de quelques gouttes du liquide provenant des opérations précédentes. Nous pouvons donc conclure à la présence d'acide lactique.

Sous une dernière réserve toutefois : c'est que notre liqueur primitive n'ait pas renfermé d'acide butyrique $CH^3—CH^2—\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}—COOH$ corps qui normalement ne doit pas se trouver dans la fermentation lactique. Toutefois, pour être certain de son absence, nous avons utilisé une technique, basée sur l'extraction éthérée simultanée des acides lactiques, butyriques et acétiques :

Dans une ampoule à décantation on met : 150 cc. de jus de choucroute, 10 gouttes d'acide sulfurique et 100 cc. d'éther. On agite, en évitant d'émulsionner le mélange. On recueille dans une capsule la solution éthérée et on l'évapore au bain-marie. Le résidu est repris par 50 cc. d'eau distillée et cette solution aqueuse est partagée en trois fractions :

Sur la première, on recherche l'acide butyrique.

1. 10 cc. du soluté aqueux sont additionnés de quelques fragments de chlorure de calcium. On agite fortement ; il ne se forme ni gouttelettes graisseuses, ni odeur caractéristique.

2. 10 cc. du soluté aqueux sont additionnés de 5 gouttes d'acide sulfurique et 10 gouttes d'alcool éthylique. On chauffe légèrement, il ne se développe pas l'odeur caractéristique de butyrate d'éthyle.

3. Enfin, une dernière réaction est la suivante : Dans un tube à essai, on met 5 cc. de soluté aqueux, 5 cc. eau oxygénée, 1 cc. d'une solution à 5% de sulfate de fer

ammoniacal dans de l'acide sulfurique au centième, on porte, pendant 5 minutes, au bain-marie à 80°. On retire de l'eau, on ajoute 6 gouttes de lessive de soude, on agite, puis on plonge le tube dans un récipient d'eau froide et on filtre après refroidissement complet, pour éliminer l'hydrate de fer. A 5 cc. ou 6 cc. de filtrat, on ajoute 3 gouttes de lessive de soude et 3 gouttes d'une solution à 5 % de nitroprussiate de sodium, on agite pour sursaturer, de l'acide acétique. Il ne s'est pas développé de teinte rose ni rouge. Nous pouvons donc affirmer qu'il n'y avait pas d'acide butyrique dans le jus de choucroute au stade où nous l'avons analysé.

Pour l'acide lactique, à titre de contrôle, nous avons opéré sur la deuxième fraction du soluté aqueux, avec le réactif de Berg, il a donné la coloration jaune attendue.

La troisième fraction enfin, nous a servi à chercher l'acide acétique. Dans une capsule de porcelaine, on met 10 cc. du soluté que l'on neutralise par quelques gouttes de soude. On évapore jusqu'à résidu sec. On ajoute une pincée d'anhydride arsénieux, et on calcine le tout, il ne se développe pas l'odeur alliacée caractéristique du cacodyle, qui se forme en présence d'acide acétique. Ce corps ne se trouve donc pas dans notre jus.

Il nous reste à identifier le corps qui a précipité au bain-marie, en milieu neutre, en présence de chlorure de calcium. Le précipité est soluble dans l'acide chlorhydrique au deuxième et il réduit fortement le permanganate. Nous avons donc conclu à la présence d'oxalate.

En résumé, à un stade relativement avancé de la fermentation. le jus qui en résulte, renferme les corps suivants, représentant des fins d'étapes importantes dans le mécanisme complet de la dégradation : glucose, lévulose. acide lactique, acide citrique et acide oxalique.

Il nous reste à voir maintenant quels sont les intermédiaires donnant naissance à ce corps, ou les produits de dégradation résultant de leur disparition, au fur et à mesure que le sucre ou l'acide lactique, par exemple, servent d'aliment aux microorganismes qui continuent à pulluler dans la macération.

Les sucres attaqués par certains microorganismes donnent au bout de la chaîne de leurs transformations de l'alcool éthylique. Nous avons cherché ce corps de la façon suivante :

On soumet le jus de choucroute à la distillation et on

recueille le premier quart distillé. Le distillat est mis en totalité dans deux tubes.

Dans le premier, on ajoute une goutte de chromate de potasse à 1%, on acidule fortement avec l'acide sulfurique et on chauffe ; il ne se forme pas de coloration verte.

Dans le second, on met 50 cc. du distillat, on acidule par 2 cc. 5 d'acide sulfurique, on ajoute 1 cc. d'une solution à 3% de permanganate de potassium et on le laisse 3 minutes en contact, à froid, puis on ajoute 1 ou 2 gouttes de bisulfite de sodium pour décolorer, et un égal volume de réactif de Schiff. La fuchsine bisulfitée ne se recolore pas ; par conséquent, il n'y a pas production d'alcool dans cette fermentation.

S'il n'y a pas d'alcool éthylique, cela ne signifie pas qu'il n'y ait pas de fonction alcool dans la macération. Nous avons déjà vu la présence d'acide lactique et du glucose, par exemple. Mais il se pourrait très bien que le produit de la fermentation renferme ce triose que nous mentionnions plus haut, la glycérine.

Les méthodes de caractérisation de ce corps sont assez délicates et la meilleure nous a parue celle, préconisée par Denigès (16), qui consiste à oxyder le glycérol en méthylglyoxal et à caractériser ce dernier. L'oxydation se fait par l'eau de brome, suivant la réaction

$$\begin{array}{l} CH^2—CH—CH^2 \\ \quad|\quad\;|\quad\;| \\ \quad OH\quad OH\;\; OH \end{array} + 2\ Br = \begin{array}{l} CH^2—CO—CH^2 \\ \quad\;\;|\qquad\;\;| \\ \quad\;\; OH\qquad OH \end{array} + 2\ HBr$$

Le dioxyacétone intermédiairement formé, subit une anhydrisation interne sous l'action de l'acide sulfurique, suivant la réaction

$$\begin{array}{l} CH^2—CO—CH^2 \\ \quad|\qquad\;| \\ \quad OH\qquad OH \end{array} = CH^3—CO—CHO + H2O$$

Le mélange dioxyacétone et méthylglyoxal se caractérise de la façon suivante : en présence d'acide sulfurique, avec la codéine, il donne une coloration bleu vert ; avec le β-naphtol, une coloration vert émeraude ; avec la résorcine, une coloration rouge dichromate ; avec le thymol enfin, une teinte rouge sang.

La caractérisation de la glycérine par cette méthode n'est donc possible qu'à la condition que notre solution

ne renferme pas de méthylglyoxal ou de dioxyacétone. C'est ce dont nous nous sommes assurés en premier lieu :

Dans un tube à essai, on met 0 cc. 1 de solution alcoolique au 1/20 de β-naphtol, on ajoute 0 cc. 4 de jus de choucroute. On verse ensuite 2 cc., exactement mesurés, d'acide sulfurique pur, puis on les porte durant deux minutes au bain-marie. On observe une coloration vert émeraude.

Dans un autre tube à essai, on met 0 cc. 1 de solution alcoolique au 1/20 de codéine. On ajoute 0 cc. 2 de jus de choucroute et 0 cc. 2 d'eau, on verse ensuite 2 cc., exactement mesurés, d'acide sulfurique pur, on agite, et puis on le porte, durant 2 minutes, au bain-marie bouillant. On observe une coloration bleu vert.

Les deux autres réactions ont donné des résultats douteux. Mais il est certain que notre macération renferme, sinon du méthylglyoxal, du moins un corps extrêmement voisin ; nous reviendrons d'ailleurs là-dessus un peu plus loin.

Retenons pour le moment que nous ne pouvons pas songer à caractériser la glycérine par ce procédé. Une voie nous semblait offerte : débarrasser le jus de tous les corps à fonction alcool, autres que la glycérine et caractériser cette fonction dans le liquide restant. Mais ce problème relève de techniques opératoires que nous ne pouvions songer à entreprendre. Une autre méthode consisterait à apprécier au colorimètre l'intensité de la coloration verte obtenue avec le β-naphtol, avant et après oxydation par l'eau de brôme. Cette technique ne nous a toutefois pas paru assez sûre pour nous permettre d'affirmer la présence ou l'absence de ce corps, dans les produits de la fermentation de la choucroute. Il y a là un point qui reste à préciser.

Ayant donc obtenu deux réactions caractéristiques du méthylglyoxal, nous avons cherché à mettre en évidence la fonction aldéhyde, pour confirmer nos suppositions. Or, le réactif de Schiff ne se recolore pas. La fonction aldéhyde, si elle existe, est donc bloquée sous une forme que nous allons chercher à mettre en évidence. S'il existe du méthylglyoxal dans le milieu, nous devons également nous attendre à trouver son produit d'oxydation immédiat, l'acide pyruvique $CH^3—CO—COOH$. Or là, nos recherches ont été pleinement couronnées de succès. On sature le milieu de carbonate de calcium. Il se forme du pyruvate

de calcium, soluble dans l'eau, mais insoluble dans l'alcool à 95°. On concentre donc une portion de la solution renfermant le pyruvate présumé, jusqu'à un dixième de son volume environ. On filtre, et on traite le filtrat par un excès d'alcool absolu. Il se forme un précipité blanc que l'on sépare et que l'on redissout dans l'eau. Cette solution traitée par l'iode en milieu alcalin, donne lieu à la formation d'iodoforme, réaction caractéristique des fonctions cétones. La formation du sel de calcium et son insolubilité caractérise, par ailleurs, sufisamment l'acide pyruvique pour que nous soyons autorisés à conclure à sa présence certaine. Or, nous tenons à signaler ici le fait suivant : si l'on cherche à mettre en évidence la fonction CH^2-CO-, par la réaction de Legal, on aboutit à un échec complet. Ici encore il est probable qu'il s'agit de groupements inhibiteurs. Deux hypothèses sont possibles : ou bien le voisinage immédiat des fonctions cétone et aldéhyde, et cétone et acide empêche les réactions caractéristiques pour chacun de ces groupements de se faire normalement. Ou bien, nous avons affaire à un équilibre entre le méthylglyoxal et l'acide pyruvique, équilibre dans lequel ces deux corps se trouvent sous forme énolique :

$$CH^2 = \underset{\underset{OH}{|}}{C}-CHO \rightleftarrows CH^2 = \underset{\underset{OH}{|}}{C}-COOH$$

Dans ce cas, la double liaison doit pouvoir se mettre en évidence. Nous avons effectivement constaté que le permanganate dilué, agissant à froid sur la solution renfermant ces deux corps supposés était immédiatement réduit, ce qui serait dû à la rupture d'une double liaison.

Ce ne sont là que des hypothèses que nous ne pouvions songer à vérifier entièrement, sans sortir beaucoup du cadre de notre étude. Il n'en reste pas moins que nous avons acquis un certain nombre de points, certains, qui vont nous permettre de comprendre l'ensemble des opérations se déroulant dans la fermentation de la choucroute, telle que nous l'avons étudiée. Cette vue d'ensemble fera l'objet du dernier chapitre de notre travail. Pour le moment, nous sommes en possession des éléments suivants. Le jus de fermentation, contenant encore des débris de cellulose provenant des feuilles de chou, renferme en outre : du glucose, de la lévulose, de l'acide citrique, de

l'acide lactique et un corps représentant la plaque tournante d'un grand nombre de fermentations, c'est-à-dire le méthylglyoxal ou son composé d'oxydation immédiat, l'acide pyruvique.

Au fur et à mesure que nous avancerons dans notre étude, nous verrons l'importance de chacun de ces corps.

CHAPITRE II

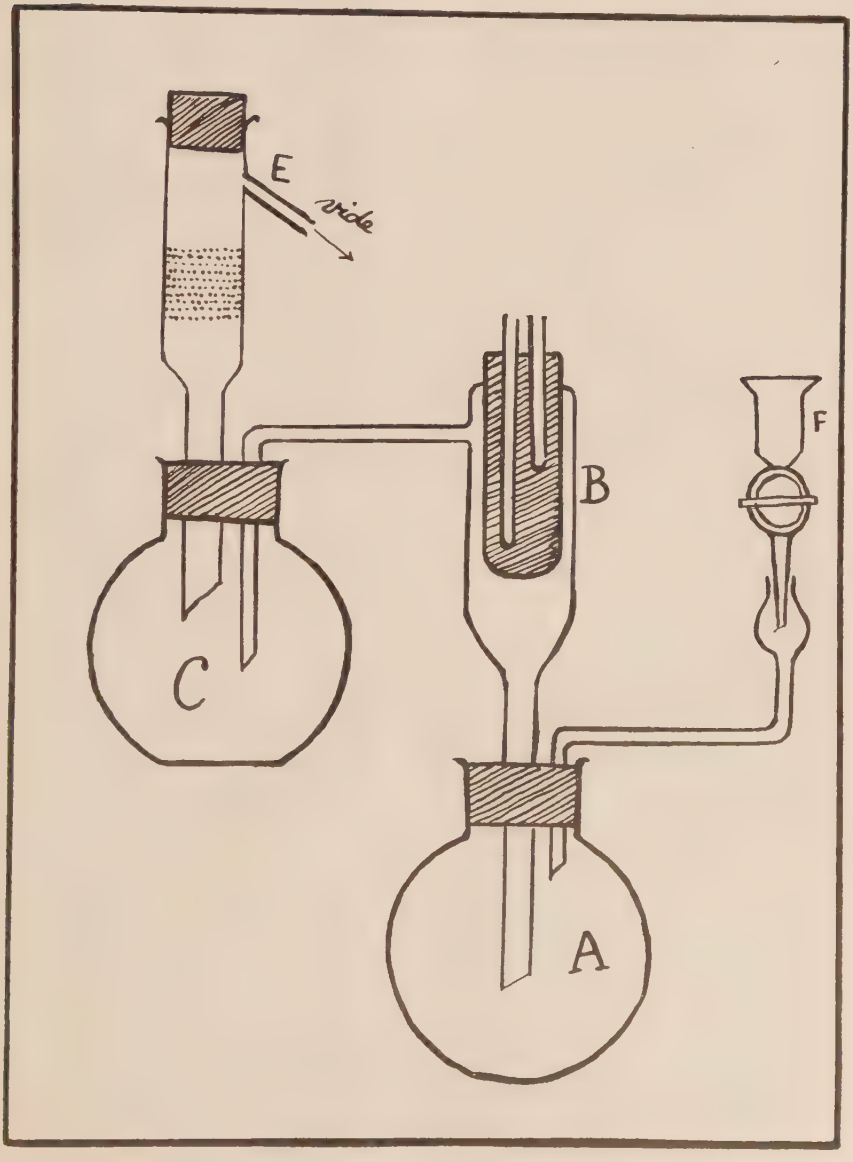
L'EVOLUTION DES PRINCIPAUX CONSTITUANTS SUCRES ET ACIDE LACTIQUE

D'après les organismes qu'il nous a été possible d'isoler, il était évident que le corps le plus intéressant que nous devions nous attendre à trouver dans cette fermentation est l'acide lactique. Or, il ne peut tirer son origine que des sucres. C'est du moins une supposition que nous avons eu à tâche de vérifier. Nous avons donc procédé à des dosages journaliers de ces deux principaux constituants, sur plusieurs échantillons de jus de choucroute, d'âge varié, de constitutions variables également les uns renfermant encore des débris de cellulose, les autres ayant été filtrés, mais tous hébergeant les mêmes microorganismes et notamment l'*Oïdium Lactis*. Nous avons voulu voir, en premier lieu, comment évoluait la formation de l'acide lactique. Nous ne pouvons pas songer à tirer un renseignement sur ce point du dosage de l'acidité totale du jus : en dehors de l'acide lactique, celui-ci renferme, en effet, du citrique, du pyruvique et certainement d'autres encore que nous n'avons pas pu caractériser. L'acidité totale ne nous servira que de contrôle pour l'ensemble de l'évolution : aussi n'avons-nous pas négligé de l'établir quotidiennement.

Le dosage de l'acide lactique nous a posé un problème qui, de prime abord, semblait mal aisé à résoudre. Nous y sommes toutefois parvenus en appliquant la méthode de M. Polonovski (17) du dosage de cet acide dans le sang. Le principe en est simple : on commence par débarrasser la solution à titrer des sucres, puis des produits

volatiles. On oxyde alors la fonction alcool de l'acide lactique en aldéhyde, par le permanganate. On reçoit cet aldéhyde dans du bisulfite ; et l'on titre à l'iode, la quantité combinée ou bisulfite.

Ces opérations nécessitent un appareil spécial et la technique opératoire que voici :



L'oxydation de l'acide lactique à l'état d'acétaldéhyde par le permanganate de potassium, en présence de sulfate de manganèse est quantitative. L'acétaldéhyde est entraîné par un courant d'air dans une solution de bisulfite qui le fixe. Le bisulfite combiné est ensuite dosé par une solution titrée d'iode.

1° Elimination des glucides.

A un volume exact du jus de choucroute, 30 cc. par exemple, on ajoute 4 cc. d'une solution de sulfate de cuivre à 10%, et on neutralise presque exactement avec de la soude concentrée, en présence de papier de tournesol, en évitant de produire la précipitation de l'hydrate de cuivre. On ajoute alors 10 cc. de lait de chou et on complète exactement à 50 cc. avec de l'eau. On laisse en contact pendant 4 à 5 heures. Après filtration sur un filtre sec, le liquide peut être employé pour le dosage de l'acide lactique.

2° Oxydation permanganique.

La solution d'acide lactique à doser est versée dans le ballon « A » avec 10 cc. de solution sulfurique de sulfate de manganèse et assez d'eau pour amener le volume total à 80 cc.-100 cc. On ajoute un peu de talc ou des billes de verre pour régulariser l'ébullition et on réunit le ballon au condensateur « B ». On produit alors une aspiration par le tube « E » au moyen d'une trompe à eau pendant que l'on chauffe à l'ébullition avec une petite flamme. On enlève ainsi les substances volatiles qui viendraient se fixer sur le bisulfite.

Au bout de deux minutes, on arrête l'ébullition et l'aspiration, et on enlève le ballon « C » qui est lavé avec soin. On y introduit 1 cc. de solution de bisulfite de sodium à 1%, et assez d'eau pour que les perles de verre du tube « D » soient recouvertes de liquide pendant l'aspiration de la trompe.

On verse dans l'entonnoir à robinet « F » une solution très diluée de permanganate, faite au moment de l'emploi, en diluant du MnO_4K au 1/10, et on la fait couler dans l'entonnoir effilé, placé au-dessous, assez lentement pour que le liquide contenu en « A » reste incolore ou soit à peine coloré, en même temps que l'on recommence l'ébullition et l'aspiration à la trompe. Lorsque la teinte rose persiste pendant une minute, on cesse l'introduction du permanganate.

On continue l'ébullition pendant encore 5 minutes, pour enlever la totalité de l'aldéhyde, puis on supprime le chauffage et on arrête l'aspiration. Le ballon « C » est détaché et la colonne de perles de verre lavée à 7 reprises avec chaque fois 5 cc. d'eau.

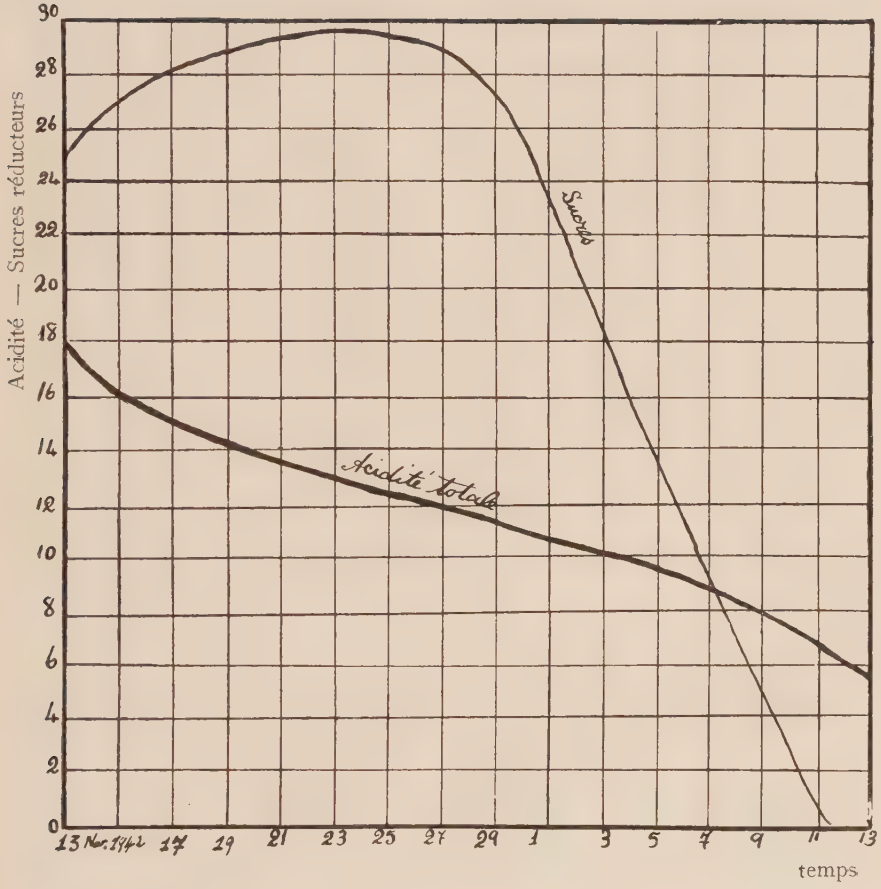
On titre alors le bisulfite non combiné à l'aldéhyde au moyen d'une solution d'iode $\frac{N}{10}$ en présence d'amidon soluble comme indicateur en s'arrêtant un peu avant la fin et on termine au moyen d'iode $\frac{N}{100}$ de façon à avoir un virage bleu pâle. Le bisulfite combiné est maintenant libéré par addition d'une pincée de bicarbonate de sodium en poudre et titré aussitôt avec l'iode $\frac{N}{100}$ jusqu'au même virage. La teinte bleue doit persister au moins 15 secondes. L'opération est terminée si une petite quantité de bicarbonate ne fait plus disparaître la teinte bleue.

1 cc. d'iode $\frac{N}{100}$ correspond à 0 mgr. 22 d'acétaldéhyde et 0 mgr. 45 d'acide lactique.

Nous avons obtenu les résultats suivants, consignés dans les tableaux ci-contre. Pour mieux nous rendre compte de leur signification, nous les porterons sous forme de courbe ; nous analyserons l'un et l'autre tout à l'heure. Simultanément, en effet, nous avons dosé l'acidité totale, pour laquelle les chiffres du tableau correspondent à la courbe. Et pour compléter l'étude de l'évolution de ces corps, il nous fallait doser les sucres réducteurs. Voici les chiffres obtenus dans chaque cas avec les courbes correspondantes :

PREMIER TABLEAU
à partir du 13 novembre 1941 jusqu'au 12 décembre 1941

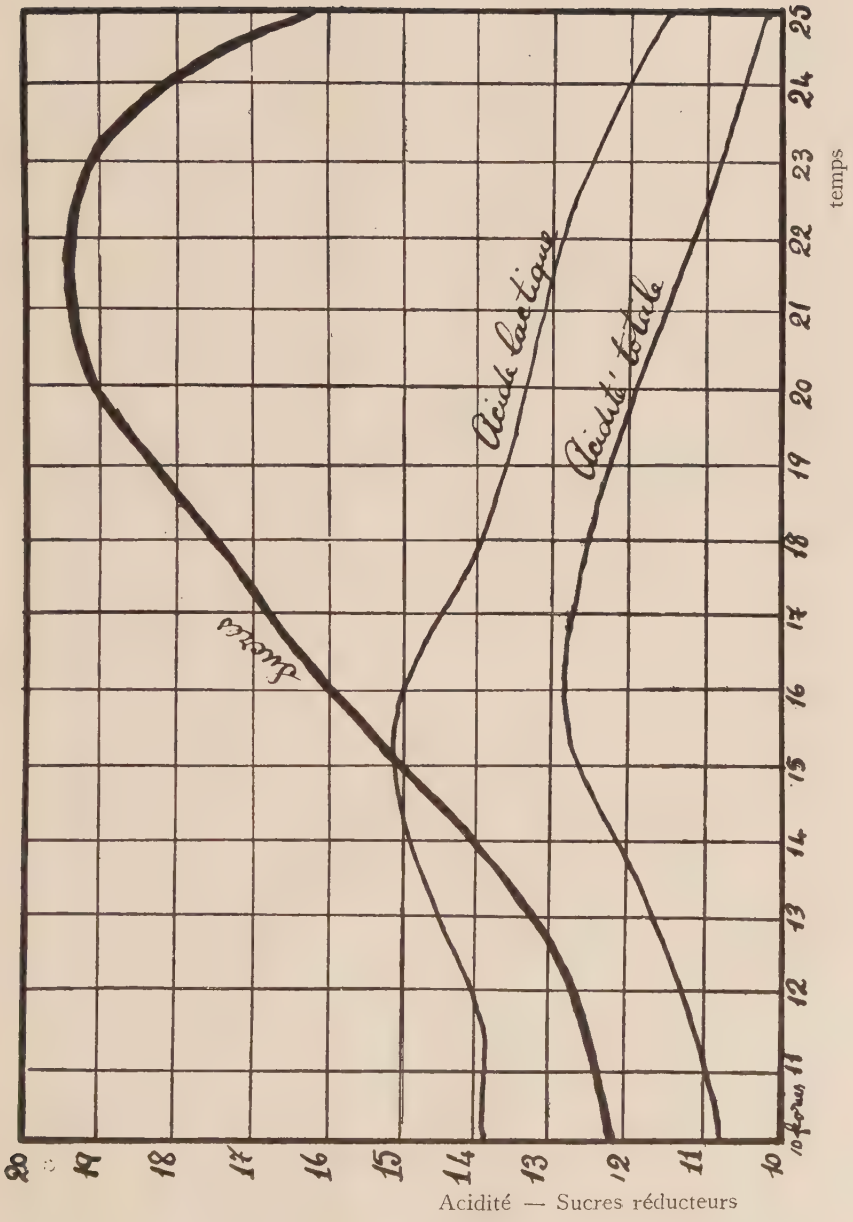
Jours	Acidité totale Centigr. 0/00	Sucres réducteurs Grammes 0/00
13 Novembre 1941 ..	18,0	25,1
15 — ..	16,0	27,0
17 — ..	15,0	28,0
19 — ..	14,2	28,7
21 — ..	13,5	29,1
23 — ..	13,0	29,3
25 — ..	12,4	29,4
27 — ..	12,0	28,8
29 — ..	11,2	27,2
1er Décembre 1941...	10,7	23,2
3 — ..	10,1	18,3
5 — ..	9,6	13,5
7 — ..	8,7	9,0
9 — ..	7,7	4,6
11 — ..	6,6	0,4
13 — ..	4,8	0,0


Acidité — Sucres réducteurs
30
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Sucres
Acidité totale
13 Nov. 1942
17
19
21
23
25
27
29
1
3
5
7
9
11
13
temps

DEUXIEME TABLEAU

à partir du 10 février 1942 jusqu'au 25 février 1942

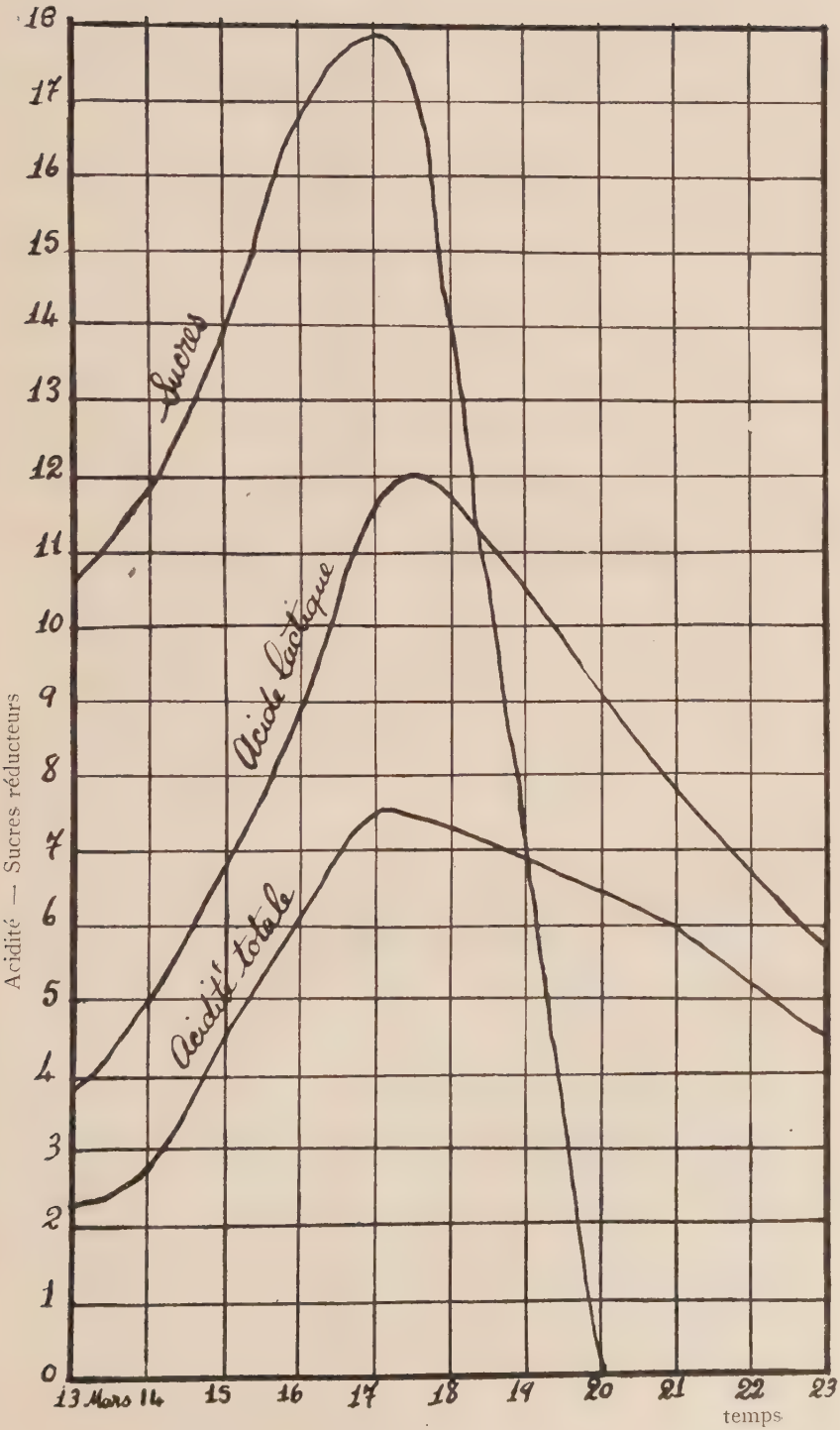
Jours	Acidité totale Centigr. 0/00	Acide lactique Milligr. 0/00	Sucres réducteurs Grammes 0/00
10 Février 1942 .	10,8	13,95	12,3
11 — .	11,1	13,95	12,6
12 — .	11,2	14,1	12,8
13 — .	11,8	14,6	13,5
14 — .	12,2	15,1	14,0
15 — .	12,7	15,1	15,0
16 — .	12,9	15,0	15,9
17 — .	12,8	14,5	16,9
18 — .	12,6	14,0	17,7
19 — .	12,3	13,7	18,6
20 — .	12,0	13,5	18,9
21 — .	11,6	13,2	19,5
22 — .	11,3	12,9	18,9
23 — .	10,8	12,5	18,3
24 — .	10,5	12,0	17,0
25 — .	10,2	11,5	15,5


Sucres
Acide lactique
Acidité totale
temps
Acidité — Sucres réducteurs

TROISIEME TABLEAU

à partir du 13 mars jusqu'au 23 mars 1942

Jours	Acidité totale Centigr. 0/00	Acide lactique Milligr. 0/00	Sucres réducteurs Grammes 0/00
13 Mars 1942 ...	2,4	3,9	10,7
14 — ...	2,75	5,0	10,8
15 — ...	4,5	6,9	14,0
16 — ...	6,3	9,0	16,9
17 — ...	7,5	11,2	17,9
18 — ...	7,3	11,2	14,0
19 — ...	6,8	10,5	7,0
20 — ...	6,4	9,0	0
21 — ...	5,8	7,7	0
22 — ...	5,2	6,6	0
23 — ...	4,5	5,7	0


Sucres
Acide lactique
Acidité totale
Acidité — Sucres réducteurs
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
13 Mars 14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
temps

CHAPITRE III

CONCEPTIONS ACTUELLES SUR LE MECANISME DE LA TRANSFORMATION D'UN HEXOSE EN ACIDE LACTIQUE

Les transformations ultérieures

Nous avons vu que dans le jus de choucroute ayant un certain âge, il s'est développé une quantité assez notable de glucose et de lévulose. Ces deux hexoses vont être attaqués à leur tour pour donner naissance à un certain nombre de produits. Le catabolisme des sucres a donné lieu à des interprétations diverses, dont voici les plus récentes. D'après M. Schoen (18), l'hexose dans un premier temps, se combine aux radicaux phosphorés existant dans tout milieu organique naturel, pour donner un hexose-phosphate, susceptible de se scinder en deux molécules de triosephosphate. Ces corps donnent du métylglyoxal hydraté, qui, d'une part, se transforme en acide pyruvique, et d'autre part, en acide lactique et glycérine. L'acide pyruvique enfin, réagissant sur un ester phosphorique du glycirol, régénère deux molécules d'acide lactique et d'acide phosphorique. L'ensemble des opérations peut se schématiser de la façon suivante :

Hexose $C^6H^{12}O^6$

hexosephosphate + triosephosphate

$$2\ CH^3—CO—CH\begin{cases}OH\\OH\end{cases}$$

(*méthylglyoxal hydraté*)

$CH^3—CH(OH)—COOH$ (*acide lactique*) + $CH^2(OH)—CH(OH)—CH^2(OH)$ (*glycérine*).

$CH^3—CO—COOH + 2\ H^2$ (*acide pyruvique*) + $CH^2(OH)—CH(OH)—CH^2—O—PO^3H^2$

$2\ CH^3—CH(OH)—COOH + PO^4H^3$ (*acide lactique*).

Voici d'autre part ce qu'écrit M. Aubel (19) sur le métabolisme microbien de l'acide lactique et de l'acide pyruvique :

« On admet généralement une relation étroite entre l'acide pyruvique et l'acide lactique. Chez les microbes, en particulier Mozé a montré qu'il existe des bactéries capables de produire de l'acide pyruvique aux dépens de l'acide lactique ; d'autre part, il nous a été possible d'obtenir l'acide lactique, au cours de cultures faites sur acide pyruvique. Ces faits ont suggéré l'idée d'une interdépendance des deux acides. Cependant, la fermentation lactique et la fermentation pyruvique sont peut-être, au contraire, complètement distinctes et correspondent à deux modes de scission de la molécule d'hexose. Dans ce cas, la transformation de l'acide lactique en acide pyruvique peut trouver son explication dans la nécessité où est le microbe d'élaborer des matériaux constituant son protoplasma, en partant de l'acide cétonique. Et la transformation de l'acide pyruvique en acide lactique n'apparaît que comme un épiphénomène ; l'acide lactique n'étant formé qu'en faible proportion.

C'est en poursuivant ces recherches que nous avons été amenés à isoler des eaux de conduite de la ville de Paris un microbe transformant en quantités notables le glucose en acide pyruvique d'abord, puis en acide lactique.

Nous avons étudié successivement l'action du microorganisme sur le glucose, le pyruvate de soude et le lactate de calcium.

L'impression qui se dégage est en faveur de l'hypothèse énoncée plus haut, des deux fermentations distinctes. Quels sont les modes de dégradation du glucose qui conduisent aux deux acides étudiés ? Il est impossible encore de le dire. Mais nous pouvons émettre à ce sujet une hypothèse de travail. Le premier mode, producteur d'acide lactique, passerait par l'aldéhyde glycérique, ce qui confirmerait les idées de Oppenheimer et le second mode producteur d'acide pyruvique passerait par le méthylglyoxal ».

Nous nous sommes contentés de citer les vues les plus récentes sur ce problème délicat. On voit que des divergences notables subsistent entre les auteurs, les uns séparant les processus producteurs d'acide pyruvique de ceux engendrant l'acide lactique, les autres, au contraire, les réunissant en un seul.

Pour notre part, il ne nous a pas été possible d'isoler l'aldéhyde glycérique qui serait l'intermédiaire nécessaire à la production de l'acide lactique d'après Aubel.

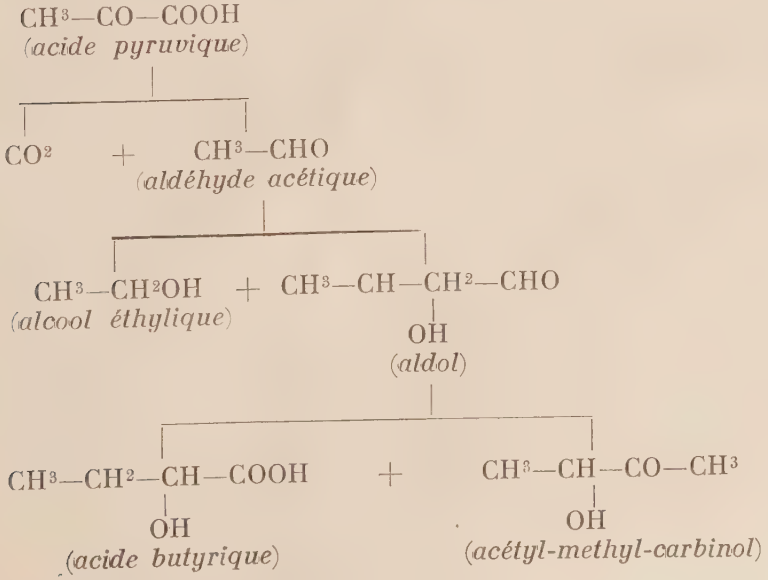
Par contre, nous avons montré, dans un chapitre précédant que le jus de la fermentation renfermait, si non du méthylglyoxal, du moins un corps très voisin et il se pourrait fort bien que ce fut le méthylglyoxal hydraté qui ne donnerait pas exactement les mêmes réactions. Par ailleurs, nous avons vu la présence d'acide pyruvique. Pour admettre le schéma proposé par Schoen, il restait à montrer l'existence des composés phosphorés. Nous avons opéré de la façon suivante : 100 cc. de jus de choucroute sont traités par quelques centimètres cubes de NaOH à 10% ; on porte au bain-marie jusqu'à 100°, pour hydroliser les esters phosphoriques. On concentre jusqu'à un volume de 25 cc. environ et on filtre. Le filtrat acidifié par de l'acide nitrique est traité par 1-2 cm^3 de réactif nitro-molybdique : à chaud il se développe une coloration jaune intense, suivie de la formation après refroidissement, d'un précipité jaune, semblant donc indiquer la présence de traces d'acide phosphorique. Etant donné que ce corps est régénéré au fur et à mesure que la transformation se poursuit, il est très compréhensible qu'il n'existe qu'en faible quantité, son intervention étant du type de celle d'un cataliseur.

La suite des opérations semble donc s'accorder avec le mécanisme proposé par Schoen, et il est extrêmement vraisemblable que l'acide lactique, que nous trouvons en

solution, provient en dernier ressort à la fois de la décomposition du méthylglyoxal hydraté et de l'acide pyruvique, ce que justifie l'importance que nous avons attribuée à ces corps dans le chapitre où nous indiquions comment nous les avons caractérisés.

C'est à ce stade de la fermentation que nous avons arrêté nos recherches, les transformations ultérieures étant bien connues. Elles ont fait l'objet de nombreuses études. Nous les indiquerons toutefois, pour que cet exposé sur la fermentation de la choucroute soit aussi complet que possible.

Ainsi que nous l'avons vu dans le chapitre précédent, l'acidité du milieu décroît régulièrement à partir d'un certain moment pour devenir nulle, puis le milieu s'alcalinise et la fermentation s'achève en milieu alcalin. Ces transformations ont pour origine l'*Oïdium lactis* qui s'est nourri aux dépens de l'acide lactique en transformant ce corps en une série de composés de plus en plus simples, dont les derniers sont CO^2 et H^2O. Simultanément, l'acide pyruvique évolue de son côté, engendrant les corps suivants : par décarboxylation, il forme de l'aldéhyde acétique. Celui-ci se réduit en partie pour donner de l'alcool éthylique et s'aldolise pour une autre part. L'aldol peut, soit s'oxyder sur la fonction aldéhyde et se transposant, donner de l'acide butyrique, soit uniquement subir la transposition intramoléculaire et se transforme en acétyl-méthyl-carbinol, produit ultime de ces transformations. On peut schématiser l'ensemble des opérations de la façon suivante :



Nous arrivons ainsi au terme de cette longue suite de réactions qui constitue la fermentation du chou destiné à devenir choucroute.

Nous sommes loin d'en avoir élucidé tout le mécanisme et bien des points soulèveront encore des recherches et des discussions. Nous avons limité nos investigations aux deux grands stades principaux : Transformation de la cellulose en glucides, et transformation des glucides en acide lactique. Maintenant, c'est à l'interprétation de nos résultats concernant ces transformations que nous consacrons le dernier chapitre de cette partie.

INTERPRÉTATION DE NOS RÉSULTATS

Reportons-nous aux courbes de l'évolution des sucres et de l'acidité.

Une première remarque s'impose : les courbes de l'acidité totale et de l'acide lactique sont presque rigoureusement parallèles et superposables. Cela indique que l'acidité totale revient pour la plus grande part à l'acide lactique ; nous avons ainsi un moyen de contrôle dans le dosage de ce corps. Ce qui ressort en deuxième lieu de l'examen des courbes, c'est qu'elles passent chacune par un maximum. Dans le cas de l'évolution normale, ces maxima coïncident à très peu de choses près.

Si nous examinons les courbes individuellement, on constate d'abord une ascension marquée du taux des sucres passage par un maximum, puis chute très rapide de ce corps. Il en est exactement de même pour l'acide lactique qui passe par son taux maximum quand les sucres atteignent le leur. Que signifient ces faits ? Voici l'interprétation que nous proposons : dans le jus, sur lequel nous faisons nos dosages, subsistent des restes importants de produits cellulosique plus ou moins attaqués. Les ferments butyriques s'attaquent à ces restes, faisant ainsi monter le taux des sucres. Mais le fait de faire pénétrer de l'air dans le jus de fermentation ralentira peu à peu cette action, alors qu'inversement, il favorise le développement des bactéries vivant aux dépens du sucre, *Bacille Coli* et *Bacillus Lactis aérogènes*. Or, le développement de ces organismes entraîne la montée de l'acide lactique. Mais l'augmentation de l'acide lactique appelle le développement des champignons vivant aux dépens de ce composé : « *Oïdium Lactis* » et « *Saccharomyces mycoderma* ». Pendant un certain temps, la production et la disparition de l'acide lactique s'équilibrent ; c'est l'explication du palier correspondant au maximum du

sucre. Puis la production finit par fléchir et la destruction l'emporte, entraînant la chute rapide de l'acide lactique et corrélativement celle de l'acidité totale.

Telle est l'allure normale du phénomène. Celui-ci s'explique donc très bien par l'intervention simultanée ou successive d'organismes agissant en sens inverse. Il peut se produire des modifications telles que celles que nous voyons sur les courbes n° 2. Dans ce cas, en effet, les maxima ne coïncident pas. L'acide lactique atteint son maximum avant que le sucre n'ait atteint le sien. Cela s'explique par un développement prématuré de l'*Oïdium Lactis* dans ce jus. Au fur et à mesure que l'acide est produit, il est consommé par ces microorganismes, alors que le sucre continue à monter pendant ce temps-là, sous l'influence des ferments butyriques. Ce n'est que lorsque le développement du *Bactérium coli* et du *Bacillus lactis* est assez intense que le sucre diminue notablement ; mais à ce moment-là le développement de l'*Oïdium Lactis* est suffisamment poussé, pour qu'il consomme la presque totalité de l'acide lactique produit, ce qui explique l'allure presque en palier de la courbe de cet acide. Peu à peu d'ailleurs la chute s'accentue, pour tendre vers les derniers stades.

Il nous reste enfin à rendre compte de la production des cristaux de mannitol. Ainsi que nous l'avons vu, ce corps se forme sous l'influence du ferment mannitique ; mais celui-ci ne se développe qu'en milieu neutre ou alcalin. Par ailleurs, il lui faut la présence de sucre. Pour réunir ces éléments, il faut donc se placer dans des conditions spéciales, notamment en absence d'oxygène. L'attaque de la cellulose se produira ; il se forme du sucre, qui sera partiellement attaqué, car il est inévitable qu'il reste un peu d'air. Il se formera donc un peu d'acide lactique ; mais tout l'oxygène une fois disparu, le sucre n'est plus attaqué et l'acide lactique finira par être consommé par l'*Oïdium*. C'est à ce moment-là que le ferment mannitique pourra agir sur le sucre restant et le transformer en mannitol ; c'est ce qui explique que nous n'avons vu apparaître ce corps qu'au bout d'un temps assez long, et que les cristaux de mannitol étaient inclus dans un voile formé de Levures. Dès que nous sommes revenus en présence d'oxygène, d'ailleurs, ils ont disparu, consommés par le *Bactérium Coli* et le *Bacillus acidi Lactici*.

Toutes les observations que nous avons donc faites au cours de ce travail, concordent, pour nous permettre de

nous faire une idée des transformations qui se passent dans la fermentation de la choucroute.

C'est en nous aidant à la fois des données bactériologiques et chimiques que nous avons pu saisir les relations unissant les phénomènes, que dans un premier temps, nous nous étions contentés d'observer.

Si ce travail n'a pas apporté de connaissance nouvelle, au point de vue pratique, sur la fabrication de cet aliment très apprécié qu'est la choucroute, nous espérons du moins qu'il a permis de mieux comprendre un certain nombre de phénomènes, qui s'enchaînent très logiquement dans le problème si ardu des fermentations en général et de la fermentation lactique en particulier.

BIBLIOGRAPHIE

1. Rolet. — Conserves de Légumes. P. 63-67.
2. J. Dybowski. — Encyclopédie Agricole. Tome II, 1888, p. 283.
3. A. Besson. — Technique Microbiologique et Sérothérapique. 1928. P. 148-159.
4. Duclaux. — Traité de Microbiologie. Tome 4, p. 311.
5. Huppe. — Mitteilung a. d. k. k. Gesundheitsamte. Tome II, 1884.
6. Gayon et Dubourg. — Annal de l'Institut Pasteur. Tome 18. Juillet 1901. P. 114.
7. Van Loer. — Duclaux, loc. cit. P. 630.
8. Mitscherlisch. — Monatsberichte der Berliner Akadémie, 1850.
9. Trecul. — Comptes-rendus. Tome LXI. P. 186 et 436. 1865.
10. Van Tieghem. — Comptes-rendus, tome 88. P. 205. 1879.
11. Omeliansky. — *Comptes-rendus* : Tome CXXI. P. 653. 1895.
12. Lanzenberg. — Bulletin Institut Pasteur. Tome I, 1903. P. 193.
13. Grimbert et Legros. — In Dopter et Sacquepée, Précis de Bactériologie. P. 500.
14. Dubourg et Gayon. — Duclaux, Microbiologie. Tome IV, P. 115.
15. Denigès. — Précis de Chimie Analytique. P. 178.
16. Denigès. — Précis de Chimie Analytique. P. 152.
17. Polonovski et Lespagnol. — Eléments de Chimie Biologique et Organique. P. 156.
18. Schoen. — Le mécanisme des fermentations.
19. Aubel. — Sur le métabolisme microbien de l'acide lactique et de l'acide pyruvique. *C. R. Ac. Sc.*, tome 176, 1923. P. 332.

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS 9
INTRODUCTION 11

PREMIERE PARTIE

La choucroute 15
Fabrication de la Choucroute 16
Chou Quintal 18

DEUXIEME PARTIE

Microbiologie de la Fermentation 19
CHAPITRE I. — Les Techniques d'isolement 19
Procédés mécaniques 20
Procédés biologiques 26
CHAPITRE II. — Organismes susceptibles d'intervenir dans la fermentation de la choucroute . . . 29
CHAPITRE III. — Les organismes isolés du jus de choucroute, les cristaux de Mannitol 33

TROISIEME PARTIE

Biochimie de la Fermentation 39
CHAPITRE I. — Les composés apparaissant à un stade avancé de la fermentation 39
CHAPITRE II. — L'évolution des principaux constituants, sucres et acide lactique 48
CHAPITRE III. — Conceptions actuelles sur le mécanisme de la transformation d'un Hexose en acide lactique 58
Interprétation de nos résultats 63
Bibliographie 66

Vu, Clermont-Ferrand, le 12 avril 1942.

Le Président du Jury,
A. SARTORY.

Vu et approuvé :

Clermont-Ferrand, le 13 avril 1942.

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,
A. SARTORY.

Vu et permis d'imprimer :

Clermont-Ferrand, le 23 avril 1942.

Le Recteur de l'Académie,
Président du Conseil de l'Université,

Pour le Recteur,
Le Vice-Président du Conseil de l'Université,
A. DANJON.